

UNIVERSITE DE NANTES

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE NANTES

ANNEE 1971-1972

N° 13

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

Marie-Thérèse MORÉ-MÉRY

MENTION TRÈS HONORABLE
avec félicitations du jury,
proposition d'impression aux frais
de l'Etat et avis favorable pour
l'échange avec les Universités
et les Facultés étrangères

née le 11 janvier 1935 à Saint Jean de la Ruelle (Loiret)

Pharmacien

Licencié ès-Sciences

Assistant à la Faculté

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 1972

METHODES D'ETUDES DES PROTEINES SOLUBLES
DES MUSCLES ADDUCTEURS DES LAMELLIBRANCHES

Leur intérêt en taxonomie et physiologie

MEMBRES DU JURY

Monsieur le Professeur MONNET, Président

Monsieur le Professeur ROUZET, Juge

Monsieur le Professeur WELIN, Juge

UNIVERSITE DE NANTES

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE NANTES

ANNEE 1971-1972

N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

Marie-Thérèse MORÉ-MÉRY

née le 11 janvier 1935 à Saint Jean de la Ruelle (Loiret)

Pharmacien

Licencié ès-Sciences

Assistant à la Faculté

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 1972

METHODES D'ETUDES DES PROTEINES SOLUBLES
DES MUSCLES ADDUCTEURS DES LAMELLIBRANCHES
Leur intérêt en taxonomie et physiologie

MEMBRES DU JURY

Monsieur le Professeur MONNET, Président

Monsieur le Professeur ROUZET, Juge

Monsieur le Professeur WELIN, Juge

Année 1971-1972

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

Mme Thérèse MORE-MERY



Née le 14 Janvier 1931 à Nantes (France)

Présentée et soutenue publiquement le 27 Juin 1972

Présidente de l'Université de Nantes

METHODES D'ETUDES DES PROTEINES SOLUBLES
DES MUSCLES ADDUCTEURS DES LAMELLIBRANCHES
Leur intérêt en taxonomie et physiologie

MEMBRES DU JURY

Monsieur le Professeur HONNET, Président
Monsieur le Professeur ROUZET, Juge
Monsieur le Professeur HELIN, Juge

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

DE NANTES

Doyens honoraires de la Faculté : MM. AUVIGNE, BOQUIEN

Professeurs honoraires de l'Ecole de Plein Exercice, de l'Ecole Nationale
et de la Faculté : MM. GUERITHAULT, GUEGEN

Doyen : M. L. SPARFEL, Directeur de l'U.E.R.

Assesseur : M.H. REVEILLERE

Professeurs titulaires :

MM.

H. BOITEAU	Toxicologie
A. COURTIEU	Bactériologie
A. FOUCAUD	Botanique et Cryptogamie
R. GUIHARD	Physique
E.P. LOSSOUARN	Chimie Pharmaceutique
R. MONNET	Matière Médicale et Pharmacologie
J. PLOQUIN	Pharmacie Chimique
M. ROUZET	Pharmacie Galénique
Y. STEPHAN	Pharmacodynamie et Chimie Biologique Pharmaceutique

Professeurs sans Chaire :

MM.

Mme Y. DE ROECK	Pharmacie Galénique
L. WELIN	Pharmacodynamie

Maîtres de Conférence agrégés :

MM.

P. ARNAUD	Physique
Y. BRUNEAU (F.F.)	Chimie Minérale et Minéralogie
Mme J. POISBEAU (F.F.)	Zoologie et Parasitologie
H. REVEILLERE	Cryptogamie
L. SPARFEL	Chimie Organique
J.F. VERBIST (F.F.)	Matière Médicale

Conservateur de la Bibliothèque Universitaire Mme GALKOWSKI

A la mémoire de mon Père

qui aurait tant aimé être parmi nous en ce jour
de soutenance de thèse.

Son affection, ses conseils ne m'ont jamais man-
qué. Ses qualités de droiture et son sens du
devoir m'ont toujours guidée.

A la mémoire de ma Grand mère

qui m'a toujours beaucoup aimée.

A la mémoire de ma Belle-Mère

trop tôt disparue mais qui avait su déjà me
prouver son affection.

A ma Mère

Elle a toujours pratiqué l'oubli de soi, le dévouement envers les autres et les siens, en particulier.

Elle a toujours été le modèle que j'ai voulu imiter.

Qu'elle soit assurée de ma profonde affection et de toute ma gratitude.

A mon Mari

En témoignage de mon affection, en remerciement pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans la conduite de ce travail

A ma fille, Frédérique

A mon frère, à mes belles-soeurs et beaux-frères

A mes neveux et nièces

A tous les miens et à mes amis

En témoignage de ma grande affection

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur R. MONNET

Professeur de Matière Médicale et Pharmacologie

Biologiste Chef de Service au Centre Hospitalier Universitaire

Il nous a toujours guidé dans notre activité universitaire, dans le domaine de l'Enseignement et de la Recherche.

Au milieu des difficultés du travail, il n'a ménagé, ni son temps, ni sa peine. Ses conseils précieux et ses encouragements inlassables nous ont maintes fois donné confiance et permis la réalisation de cette thèse.

Nous le prions de bien vouloir accepter l'expression de notre profonde reconnaissance et nous l'assurons de notre respectueux dévouement et de notre fidèle attachement.

A Monsieur le Professeur ROUZET
Professeur de Pharmacie Galénique

Nous avons été très sensible à la constante
sympathie qu'il nous a toujours manifestée.

Il s'est toujours intéressé à nos activités
universitaires et, en particulier, à nos travaux
de recherche.

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait
en jugeant notre thèse.

Qu'il soit assuré de nos sentiments dévoués et
respectueux.

A Monsieur le Professeur L. WELIN
Professeur de Pharmacodynamie

En maintes circonstances, nous avons pu apprécier
sa sollicitude.

Nous avons été encouragée par l'intérêt qu'il
portait à notre travail et nous le remercions
d'avoir accepté de faire partie de notre jury.

Nous lui exprimons ici notre sincère reconnaissance.

A Madame J. POISBEAU

Chargée des fonctions de Maître de Conférences agrégée de Zoologie
et de Biologie Animale

Elle fut pour nous un maître particulièrement
apprécié. Elle nous a orienté vers la carrière
universitaire et nous a toujours aidée de ses
conseils.

Sans elle, la mise au point de cette thèse
n'aurait pu être réalisée.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre grande
affection et l'assurance de notre dévouement.

A Mademoiselle A. FRANGER
Assistante

dont nous avons apprécié le dévouement au Service, elle nous a aidé pour l'enseignement et l'organisation des Travaux Pratiques.

Qu'elle en soit remerciée.

A Mademoiselle REBION
Assistante

dont les qualités et la collaboration dévouée ont facilité nos recherches dans le domaine de l'immunologie. Elle nous a également aidée dans les charges d'enseignement.

Nous la remercions vivement.

A Monsieur F. TAUNAY

dont la conscience et les qualités professionnelles nous ont apporté une aide précieuse pour la réalisation de ce travail

A Mademoiselle M. BIRON

qui nous a toujours aidée au Laboratoire avec beaucoup de gentillesse, d'efficacité et de dévouement.

A Mademoiselle M. EGLEM

dont la compétence et le dévouement nous ont aidée à la présentation de cette thèse

A toute l'équipe de l'imprimerie

dont l'amabilité a toujours facilité notre travail et, en particulier, l'impression de cette thèse.

Qu'ils en soient tous remerciés.

Au Docteur BRUNEAU

Directeur du Laboratoire de Photologie de la Faculté

qui nous a permis d'illustrer notre thèse de
planches photographiques réalisées avec le
souci de perfection qui le caractérise.

Nous le remercions tout particulièrement de sa
contribution à la documentation photographique
du Laboratoire, ainsi que sa collaboratrice,
Mademoiselle Longuet. Malgré les charges du
Service, ils ont toujours répondu à nos demandes
avec affabilité et complaisance.

A tous nos Professeurs de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie
de Nantes

dont l'enseignement nous a été très précieux.
Nous leur témoignons notre reconnaissance.

A tous nos Professeurs de la Faculté des Sciences de Rennes et de la
Faculté des Sciences de Nantes

qui nous ont permis d'approfondir des disciplines
d'un grand intérêt pour nos recherches.
Nous les remercions de leur enseignement.

A tous nos collègues, Maîtres-Assistants, Assistants ou collaborateurs de
la Faculté

en témoignage de notre amitié.

Aux Services Administratifs

pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans le
déroulement de notre carrière universitaire

A Madame GALKOWSKI

Conservateur de la Bibliothèque de l'Université

A Madame PARENTHOINE

A tout le personnel de la Bibliothèque

dont la serviabilité et la compétence nous ont
été particulièrement utiles au cours de nos
recherches bibliographiques

Avec nos sincères remerciements.

Nous remercions Messieurs MARTEIL et TROCHON de
l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes
qui nous ont procuré les huîtres américaines.

Nous remercions Monsieur JARNO, ostréiculteur à la
Tremblade, qui nous a fourni les huîtres japonaises de notre
expérimentation.

Par délibération du Conseil en date du 7 mars 1962, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

INTRODUCTION

Le Laboratoire de Zoologie et de Biologie Animale étudie, depuis plusieurs années, les protéines solubles des muscles adducteurs de Lamelli-branches et, en particulier, de diverses Ostreidae.

Dans sa thèse, soutenue en 1969, P. MORE a exposé les premières méthodes d'extraction et de séparation, mises au point au Laboratoire, adaptées plus spécialement aux protéines d'Ostreidae. Ces méthodes relèvent de la chromatographie par exclusion-diffusion et de l'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide. Elles ont conduit à l'isolement de fractions intéressantes, dont le poids moléculaire a pu être estimé. Leur étude s'est avérée intéressante au point de vue de la taxonomie biochimique.

Pour une meilleure séparation de certaines fractions, voire pour l'isolement à l'état pur de quelques constituants, nous avons dû faire appel à de nouvelles méthodes dans le domaine chromatographique et électrophorétique. Une étude comparative des fractions ou constituants isolés par des méthodes immunologiques et enzymologiques doit nous apporter un complément intéressant pour l'identification des genres et des espèces dans l'Embranchement des Mollusques de la classe des Bivalves.

Les travaux que nous présentons concernent essentiellement les méthodes adaptées après de nombreux essais préliminaires. A titre d'exemple, nous indiquerons certains résultats afin de discuter la valeur des techniques choisies et de préciser les moyens de contrôle des séparations obtenues (les techniques utilisées ne devant pas dénaturer les protéines).

Dans une première partie, nous rappellerons les caractéristiques structurales et physiologiques des muscles adducteurs des Mollusques Lamellibranches, la nature des protéines solubles qui passent dans les extraits étudiés, ainsi que les méthodes permettant leur fractionnement, méthodes de base, déjà utilisées par P. MORE. Toutefois, un procédé nouveau de fractionnement sur Cellogel RS sera décrit d'une manière plus détaillée. Toutes ces techniques de chromatographie et d'électrophorèse, anciennes et nouvelles, ont été appliquées à des extraits protéiques de plusieurs espèces d'Ostreidae, de Pectinidae et de Lamellibranches dimyaires.

La seconde partie de notre thèse concerne la méthode d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide non exposée dans la thèse de P. MORE. Son emploi, suivant une technique que nous avons adaptée à certaines fractions protéiques, devait nous permettre de séparer des sous-fractions, relativement pures, dont l'analyse par électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide est nécessaire pour vérifier leur homogénéité et leur pureté.

Dans la troisième partie, nous avons réuni les essais pratiqués au Laboratoire avec des méthodes immunologiques dont l'intérêt a déjà été souligné par divers auteurs en ce qui concerne d'autres espèces de Mollusques.

La quatrième partie, relative à l'emploi des méthodes enzymologiques, comporte un exposé général précédant une étude expérimentale sur deux enzymes importantes dans le métabolisme énergétique musculaire, l'adénylate kinase et l'arginine kinase. L'activité de ces deux enzymes a été déterminée sur des extraits protéiques ainsi que sur des fractions chromatographiques, ce qui a permis l'estimation de certains poids moléculaires.

PLAN GENERAL

Première Partie : METHODES DE CHROMATOGRAPHIE ET D'ELECTROPHORESE ANALYTIQUES

- Les muscles adducteurs des Lamellibranches
- Les protéines solubles - Leur extraction - Leur fractionnement
- Matériel biologique utilisé et résultats obtenus
 - . par chromatographie en couche mince,
 - . par électrophorèse en gel de polyacrylamide,
 - . par électrophorèse sur Cellogel RS.

Deuxième Partie : ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

- Méthode adoptée
 - . Principe - Appareillage - Mode opératoire
- Protocole expérimental
- Application à l'isolement des bandes caractéristiques

Troisième Partie : METHODES IMMUNOLOGIQUES

- Protocoles d'immunisation - Méthodes générales d'étude
- Mise au point des techniques et résultats des expériences

Quatrième Partie : METHODES ENZYMOLOGIQUES

- Généralités sur l'adénylate kinase et l'arginine kinase
- Méthodes générales de mesure
- Mesures des activités enzymatiques
- Localisation des activités enzymatiques sur les profils chromatographiques.
- Détermination des poids moléculaires.

CLASSIFICATION DES MOLLUSQUES ETUDIES

Ils appartiennent tous à la classe des BIVALVES encore appelés LAMELLIBRANCHES

Les critères de classification choisis sont : les branchies, la charnière des valves et les muscles adducteurs.

Ordre I : Protobranchia

Ordre II : Filibranchia

Sous ordre : Anisomyaria

Super famille : Mytiloïdea

Famille : Mytilidae

genre : *Mytilus*

Super famille : Pectinoïdea

Famille : Pectinidae

genres : *Pecten*
Chlamys

Super famille : Ostreoides

Famille : Ostreidae

genres : *Crassostrea*
Ostrea

Ordre III : Eulamellibranchia

Sous ordre : Schizodonta

Super famille : Unionoïdea

Famille : Unionidae

Sous famille : Anodontinae

genre : *Anodonta*

Sous ordre : Heterodonta

Super famille : Veneroïdea

Famille : Veneridae

Sous famille : Tapetinae

genre : *Tapes*

Sous ordre : Adapedonta

Super famille : Myoïdea

Famille : Myidae

genre : *Mya*

ABREVIATIONS EMPLOYEES DANS LA THESE

A.c.	<i>Anodonta cygnea</i>
Ad.Ki.	= A.K. : adénylate kinase
ADP	adénosine-5'-diphosphate
AMP	adénosine-5'-monophosphate
Ar.Ki.	arginine kinase
ATP	adénosine-5'-triphosphate
Bis	bisacrylamide = N, N'-méthylène bisacrylamide
B.B.P.	bleu de bromophénol
C.a.	<i>Crassostrea angulata</i>
C.ga.	<i>Crassostrea gasar</i>
C.gi.	<i>Crassostrea gigas</i>
Ch.v.	<i>Chlamys varius</i>
C.v.	<i>Crassostrea virginica</i>
D	débit d'élution
D.O.	densité optique
E	poids de l'échantillon
F	volume des fractions recueillies
G-6-P	glucose-6-phosphate
G-6-PDH	glucose-6-phosphate deshydrogénase
IMP	inosine monophosphate
LDH	lactico-deshydrogénase
mA	milliampère
M.a.	<i>Mya arenaria</i>
M.e.	<i>Mytilus edulis</i>
μM	micromole
M.R.	milieu réactionnel
nm	nanomètre

NAD	nicotinamide adénine dinucléotide, sous sa forme oxydée
NADH ₂	nicotinamide adénine dinucléotide, sous sa forme réduite
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, sous sa forme oxydée
NADPH ₂	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, sous sa forme réduite
O.e.	<i>Ostrea edulis</i>
Ov.	ovalbumine
P	pression
PEP	phosphoénol pyruvate
Pi	phosphate inorganique
PK	pyruvate kinase
P.m.	<i>Pecten maximus</i>
P.N.	partie nacrée
P.T.	partie transparente
S.F.	sous-fraction
T.d.	<i>Tapes decussatus</i>
temed	N,N,N',N'-tetraméthyl éthylène diamine
tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
U	= U.I. = unités internationales
Ve	volume d'élution des fractions
Vo	volume interstitiel du gel
Vt	volume total du gel

P R E M I E R E P A R T I E

METHODES DE CHROMATOGRAPHIE ET D'ELECTROPHORESE ANALYTIQUES

METHODES DE CHROMATOGRAPHIE ET D'ELECTROPHORESE ANALYTIQUES

A - LES MUSCLES ADDUCTEURS DES LAMELLIBRANCHES

Les muscles adducteurs des Lamellibranches sont des organes contractiles permettant le rapprochement des valves que l'élasticité de leur ligament d'union tend constamment à écarter l'une de l'autre.

Les Lamellibranches que nous avons étudiés appartiennent au groupe des monomyaires ou des dimyaires, selon qu'ils possèdent un ou deux muscles adducteurs.

Nous rappellerons sommairement la structure du muscle des Ostreidae, monomyaires, maintes fois évoqués dans les publications du Laboratoire. Par contre, nous préciserons la structure de ceux des Pectinidae qui sont également des monomyaires et de ceux des dimyaires envisagés dans nos travaux.

1) Le muscle adducteur des Ostreidae

Chez l'huître, (voir planche hors-texte I - photographies 3 et 4), le muscle adducteur est unique, de position centrale ou sub-centrale. Il per-

met la fermeture rapide des valves, pour un temps prolongé afin de lutter contre les dangers de l'émersion, des températures et salinités extrêmes ainsi que contre l'attaque des prédateurs.

Ce muscle comprend deux parties :

- la partie transparente, à fibres musculaires dites pseudo-striées, capables de contractions rapides, présente des caractères paramyosiniques ;
- la partie nacrée est formée de fibres musculaires lisses à caractères paramyosiniques encore plus marqués capables de contractions lentes et prolongées sans dépense énergétique importante et sans fatigue, intervenant dans le "catch mechanism", modalité physiologique de contraction encore mal précisée.

L'huître américaine (*Crassostrea virginica*) a un muscle important dont la partie nacrée paraît plus développée que celle des autres *Crassostrea*.

2) Le muscle adducteur des Pectinidae

La coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) et le pétoncle (*Chlamys varius*) ont, comme l'huître, un muscle adducteur formé de deux parties bien distinctes. La partie transparente, sub-centrale, a une section circulaire ; la partie nacrée qui ne représente que 10 % du poids du muscle, lui est accolée dorsalement. La figure 1 schématise l'aspect du muscle de la coquille Saint-Jacques et la figure 2, celui du pétoncle qui est très voisin.

Le muscle de *Pecten* est très développé par rapport au reste du corps car la fermeture des valves joue un rôle important dans le déplacement rapide de l'animal dans l'eau. Le poids du muscle adducteur par rapport au poids total du mollusque débarrassé de ses valves est de 1 pour 3,3 (91) ; une coquille Saint-Jacques de taille marchande pesant environ 300 grammes possède un muscle d'un poids moyen de 30 grammes.

Les parties transparente et nacrée sont séparées par du tissu conjonctif ; le faible développement de la partie nacrée serait lié, d'après MARCEAU (91), à la valeur relativement faible de l'élasticité du ligament d'union des valves.

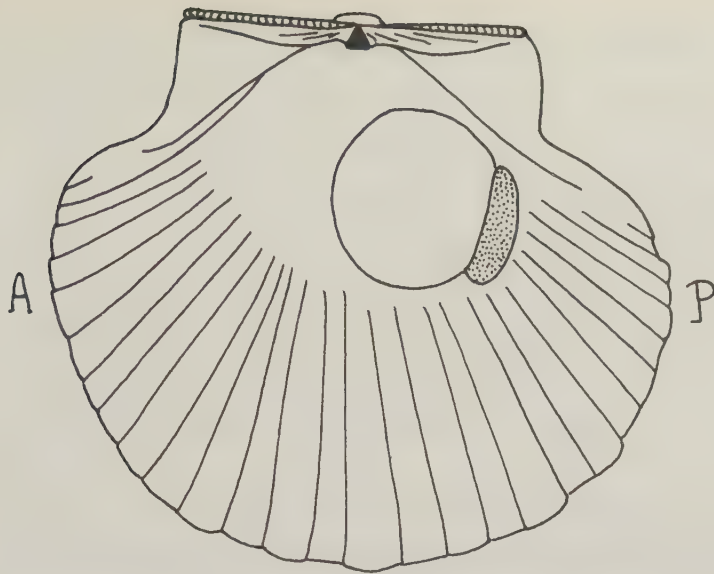


Figure 1 - Coquille Saint-Jacques
Pecten maximus (selon MARCEAU)

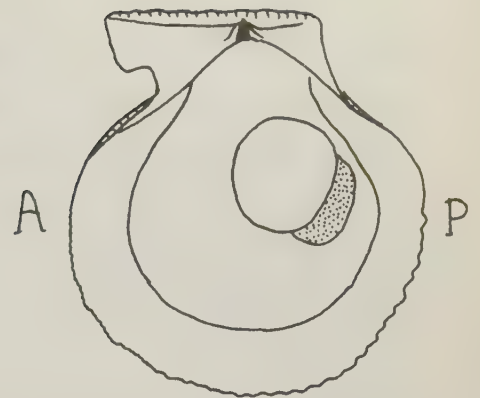


Figure 2 - Pétoncle
Chlamys varius
(selon MARCEAU)



Figure 3 - Moule
Mytilus edulis
(selon MARCEAU)

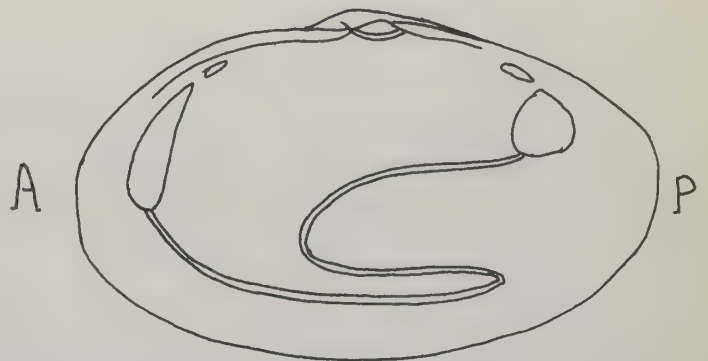


Figure 4 - Mye - *Mya arenaria* (selon VLES)

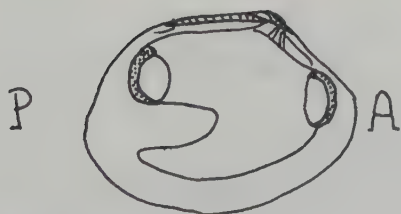


Figure 5 - Palourde
Tapes decussatus
(selon MARCEAU)

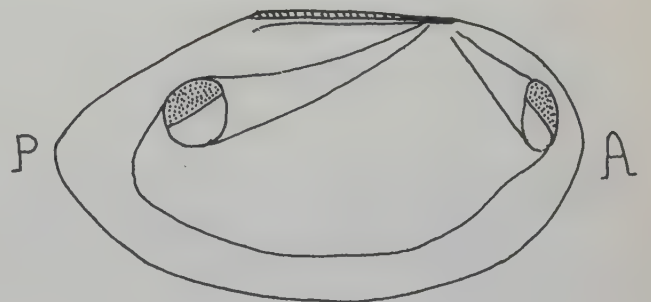


Figure 6 - Anodonte
Anodonta cygnea (selon MARCEAU)

Les schémas représentent une des valves des Lamellibranches étudiés, avec leurs impressions musculaires. Lorsque les deux parties musculaires sont bien distinctes, la partie nacrée est teintée en gris.

A : bord antérieur

P : bord postérieur

Dès 1850, LEBERT (82) observait de véritables stries transversales dans la partie transparente du muscle adducteur de *Pecten maximus*, ce que confirmeront COUTANCE en 1878 (33) et BLANCHARD en 1880 (10). MARCEAU décrit, en 1909, ce muscle comme formé de fibres à section rubannée présentant des ramifications plus ou moins nombreuses, anastomosées ou non avec celles des fibres voisines. Les fibres ne semblent pas limitées par un sarcolemme, comme le sont les fibres des muscles squelettiques des Vertébrés. La disposition des disques sombres alternant avec des bandes claires, entraîne une striation transversale, oblique ou en chevrons.

Ces travaux seront confirmés par d'autres auteurs et notamment après recours à la microscopie électronique. BOWDEN (15) note ainsi la présence de bandes A et I. Chaque bande A est traversée par une ligne H, elle-même traversée par une fine ligne M ; les bandes I comportent une ligne Z. Des précisions ont été apportées en 1958 (72) et en 1960 (59) sur ces fibres musculaires striées, formées de filaments d'actine et de myosine, glissant les uns sur les autres, comme dans le muscle squelettique du lapin.

Quant à la partie nacrée de *P. maximus*, d'après la classification de MARCEAU, elle est formée de fibres avec des fibrilles qui s'anastomosent avec des angles de 30° à 50°. Au microscope électronique, les fibres lisses à paramyosine, protéines de haut poids moléculaire, présentent deux types de filaments.

3) Les muscles adducteurs des dimyaires étudiés

Les huîtres, Lamellibranches monomyaires, au cours de leur évolution ontogénétique parallèle à leur évolution phylogénétique, présentent un stade dimyaire avec développement d'une glande à byssus permettant leur fixation. Il en résulte une réduction du muscle adducteur antérieur et l'apparition du stade monomyaire. Le muscle subsistant correspond donc au muscle postérieur des dimyaires.

Nous avons étudié la moule (*Mytilus edulis*), la mye (*Mya arenaria*), la palourde (*Tapes decussatus*) et l'anodonte (*Anodonta cygnea*), Lamellibranches dimyaires.

Chez la moule, le muscle postérieur, nettement plus développé que le muscle antérieur, est cependant capable de produire les deux types de

contractions phasique et tonique ; cette propriété pourrait appartenir à deux types de fibres entre-mêlées ou à un seul type de fibre (53).

Chez la mye, le muscle antérieur est le plus développé. Les deux muscles, d'aspect nacré, sont capables de maintenir pendant très longtemps une contraction tonique pour la fermeture des valves.

Chez la moule (figure 3) et chez la mye (figure 4 et planche hors-texte I - photographies 5 et 6), les muscles ne présentent pas deux parties morphologiquement distinctes.

Par contre, chez la palourde (figure 5) et l'anodonte (figure 6), les deux muscles adducteurs ont deux parties distinctes, une partie transparente et une partie nacrée, cette dernière moins développée que la première. Les muscles de palourde sont de taille similaire. Les muscles d'anodonte sont de taille différente. Le muscle adducteur antérieur est le plus développé.

Nous ne ferons que citer les auteurs ayant étudié la structure fine des muscles de ces différents dimyaires :

- pour la moule, SCHWALBE (149), ROULE (142), MARCEAU (91) et BOWDEN (15);
- pour la mye, VLES (172), MARCEAU (91) et PFITZEN-MEYER (131);
- pour la palourde, ROULE (142);
- pour l'anodonte, MARGO (93), WAGENER (174), ENGELMANN (47), BLANCHARD (10), MARSCHALL (96), SCHNEIDER (148), BRUCK (18) et BOWDEN (15).

B - LES PROTEINES SOLUBLES

Les protéines myofibrillaires, encore appelées "protéines de structure" ou "protéines insolubles" sont responsables de l'organisation filamenteuse des muscles. Il est nécessaire, pour les extraire, d'employer des solutions salines neutres de forces ioniques élevées ($> 0,3$). Ce sont principalement la myosine, l'actine, la tropomyosine B et la tropomyosine A (= paramyosine). Ces protéines participent directement à la contraction musculaire.

Les protéines sarcoplasmiques, appelées encore "protéines solubles" directement solubles dans les solutions salines neutres de faibles forces ioniques ($<0,2$), ont un rôle prépondérant sur le plan du métabolisme cellulaire, la plupart d'entre elles ayant une activité enzymatique. En outre, leur spécificité moléculaire leur confère un intérêt certain dans l'identification et l'évolution des espèces.

Si de nombreuses publications portent sur les protéines de structure des muscles adducteurs de Mollusques Lamellibranches, plus rares sont les travaux concernant les protéines solubles de leur sarcoplasme.

Les protéines solubles que nous étudions sont extraites du muscle total ou d'une partie musculaire, par un tampon phosphate de pH 7,5 et de faible force ionique (0,05).

Elles doivent normalement représenter un équipement enzymatique essentiel ou encore jouer le rôle de molécules porteuses. Elles représentent en outre un ensemble important de protéines spécifiques de l'espèce.

C - L'EXTRACTION ET LE FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SOLUBLES

Les tissus musculaires prélevés sont homogénéisés à l'Ultra-Turrax* et soumis à l'extraction en chambre froide sous agitation ; l'extrait est dialysé après centrifugation. Les conditions de ces opérations ont déjà été précisées dans la thèse de P. MORE (101). L'extrait est en général lyophilisé et sa teneur en protéines est déterminée par spectrophotométrie différentielle à 215-225 nm (173) et la méthode de Warburg à 280/260 nm (176).

Pour le fractionnement, nous avons utilisé, au début de nos travaux deux méthodes analytiques :

- la chromatographie d'exclusion-diffusion en couche mince de gel de Sephadex,
- l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

* Janke et Kunkel, KG/Stanfen - I.BR - GERMANY

Par la suite, nous avons essayé l'électrophorèse sur Cellogel RS.

La chromatographie d'exclusion-diffusion permet de séparer les protéines selon leurs tailles et leurs formes et, toutes choses égales, selon leurs poids moléculaires.

Dans l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines, soumises à l'action d'un champ électrique, subissent en outre un phénomène de "filtration moléculaire" ; à la fin de la migration, les protéines occuperont une place qui est fonction et de leur charge et de leur taille.

L'électrophorèse sur Cellogel RS, malgré un pouvoir de résolution plus faible que celui de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, possède un pouvoir de séparation suffisant pour permettre des comparaisons entre les protéines d'espèces voisines ; en outre, cette méthode est beaucoup plus rapide et permet d'effectuer des séries d'expériences sur un nombre élevé d'échantillons.

1) Chromatographie en couche mince

Nous avons utilisé le Sephadex G-100 de qualité "super-fine".*

Le gel est mis à gonfler trois jours dans le tampon phosphate d'extraction ; le surnageant est éliminé à l'aide d'une seringue, au moment de la confection des plaques.

Nous utilisons des plaques de verre calibrées de 5 x 20 cm et de 20 x 20 cm soigneusement nettoyées. Une ligne de départ est tracée au verso de la plaque, à 3 centimètres du bord supérieur.

Un étaleur Stahl** permet une répartition uniforme de la couche de gel que nous avons établie à 0,5 mm.

Nous employons des cuves de chromatographie en matière plastique de section carrée : 30 x 30 cm, d'une hauteur de 20 cm, avec couvercle de verre. Deux réservoirs à tampon placés à l'intérieur supportent une plaque qui fait un angle de 10° avec l'horizontale. La plaque est reliée aux deux récipients par des bandes de papier Whatman 3 MM, préalablement humectées qui assurent une bonne perfusion.

* Pharmacia, Uppsala - Suède

** Desaga, Heidelberg - R.F.A.

Les extraits sont déposés sur la ligne de départ sous forme de taches circulaires à l'aide d'une micropipette. Les taches sont éloignées l'une de l'autre de 2 centimètres. Les volumes d'extraits, de l'ordre de 5 μ l, correspondent à 45 μ g de protéines. La substance de référence est le bleu dextran 2 000 en solution à 0,4 % dans le tampon ; son poids moléculaire étant très élevé, elle est exclue et permet ainsi de suivre la migration chromatographique.

Le temps nécessaire à une bonne séparation est de 3 heures à + 16° C, en salle conditionnée, pour ce type de Sephadex.

Pour la révélation des chromatogrammes, nous utilisons le transfert des protéines sur du papier Whatman 3 MM, face lisse contre le gel. Après un temps de contact de 3 minutes, nous opérons une fixation des protéines à l'étuve à + 70° C pendant 30 minutes.

La coloration se fait dans une solution de vert de lissamine à 0,2 % dans de l'acide acétique à 5 %, pendant une heure. La décoloration par 4 bains successifs de 15 minutes dans une solution acétique à 5 % fait apparaître les protéines sous forme de taches vertes sur fond blanc.

La possibilité de faire migrer plusieurs extraits sur la même plaque rend aisées les comparaisons.

La mesure de l'importance relative des fractions est effectuée en densitométrie par réflexion à l'aide du Chromoscan*. Pour le vert de lissamine, nous employons un filtre de bande rouge, centré sur 620 nm. L'enregistrement se fait en densité optique.

2) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Nous avons simplifié la méthode ORNSTEIN et DAVIS (124) (40), selon TOMBS (163). L'extrait est déposé directement sur le "separating gel". Le système tampon est discontinu, afin d'amincir la zone de départ.

La cellule** que nous utilisons au laboratoire permet de réaliser simultanément douze électrophorèses en colonnes de gel de polyacrylamide.

* Joyce Loeb1, Gateshead-on-Tyne- G.B.

** Model 12 Apparatus = Canalco - Bethesda MD. U.S.A.

Elle est composée de deux bacs à électrode, de forme circulaire, placés sur un trépied, l'un au-dessus de l'autre (voir planche hors-texte II - photographie 7).

Des orifices, munis de joints souples d'étanchéité, sont également répartis sur une circonférence au fond du bac supérieur. Les colonnes de migrations, préparées dans des tubes de verre de 65 mm de long et de 5 mm de diamètre, y sont insérées.

Les bacs sont remplis de tampon tris-glycine (Cf p.19). La disposition du bac inférieur est réglée afin de permettre à l'extrémité inférieure des tubes de plonger dans le liquide.

Les électrodes sont reliées à un générateur pouvant travailler à intensité constante.

Le bac supérieur est muni d'un couvercle qui protège l'utilisateur contre les contacts accidentels avec le milieu conducteur. Pour enlever ce couvercle, il est nécessaire d'interrompre le circuit basse-tension qui, par l'intermédiaire d'un relais, coupe le circuit haute-tension.

Le bac inférieur est maintenu sur le trépied à l'aide de trois ergots indépendants, ce qui présente des inconvénients ; il est très difficile d'ajuster le bac à une hauteur donnée et d'en assurer l'horizontalité. En outre, la dépose du bac en cours d'électrophorèse, généralement nécessaire, est une opération longue et délicate.

Pour rendre plus maniable la cellule d'électrophorèse tout en conservant ses avantages, nous l'avons modifiée. La photographie 8 (planche hors-texte II) illustre les différentes modifications apportées.

Le trépied est placé sur une plaque de base A assurant la rigidité du système. Un support élévateur de laboratoire B est vissé sur cette plaque et le plateau supérieur du support est aménagé de façon à recevoir le bac inférieur qui devient ainsi très maniable.

Le bouton latéral du support élévateur permet de monter facilement le bac inférieur tout en le maintenant horizontal. De même, on peut à tout instant le descendre rapidement afin de prélever les colonnes en cours d'analyse.

Un index C, solidaire du plateau du support, se déplace le long d'une réglette comportant divers repères et permet d'ajuster de façon précise le bac inférieur au niveau désiré. Ce niveau diffère suivant la longueur des tubes de migration.

Pour prélever les colonnes de migration en cours d'électrophorèse, on enlève le couvercle du bac supérieur, ce qui interrompt le circuit électrique. Afin de ne pas risquer de descendre le bac inférieur de l'appareil sans avoir accompli cette opération, nous avons renforcé le dispositif de sécurité en rendant solidaires du plateau supérieur du support élévateur, par l'intermédiaire d'une plaque échancrée D, les fils du circuit basse-tension qui partent du couvercle ; nous avons placé sur ce circuit deux fiches-bananes E. Dès que l'on abaisse le bac inférieur, les fiches se séparent ; le circuit basse-tension interrompu amène alors la coupure du circuit haute-tension.

La manoeuvre est très rapide et l'interruption du courant réduite au minimum.

Les tubes de migration parfaitement propres sont plongés dans une solution de "column-coat" à 1 % en vue de faciliter les manipulations ultérieures. Un trait situé à 1 cm du bord supérieur du tube indique le niveau que doit atteindre le gel, un second trait, généralement à 2,5 cm du premier, permet de situer la longueur de la migration électrophorétique.

Les gels de polyacrylamide sont préparés par polymérisation en milieu aqueux :

- du monomère : l'acrylamide
- de l'agent de réticulation ou co-monomère : le N,N'-méthylène-bisacrylamide (bisacrylamide), après addition d'un catalyseur : le persulfate d'ammonium et d'un accélérateur de polymérisation : le N, N, N',N'-tetraméthyl-éthylènediamine (TEMED)

Nous avons fait nos expériences généralement avec un gel à 7 % en acrylamide, mais quelquefois à 10 %. Les modalités opératoires ont été rapportées dans la thèse de P. MORE (101).

Comme la dimension des pores du gel dépend principalement de la concentration en monomère et co-monomère et en second lieu du pourcentage en co-monomère, la spécification d'un gel est actuellement définie par deux

paramètres (61) :

- . T qui est le poids, en grammes du mélange acrylamide + bisacrylamide pour 100 ml de tampon ;
- . C qui est le poids de bisacrylamide en % du poids total du mélange acrylamide + bisacrylamide.

Ce que nous appelons un gel à 7 % en acrylamide est donc, compte tenu de la constitution des solutions que nous employons au laboratoire, caractérisé par les valeurs suivantes :

- . T = 7,18 %
- . C = 2,55 %

Après la polymérisation de 30 minutes, les colonnes de gel sont placées dans les joints d'étanchéité du bac supérieur d'électrophorèse, le bac inférieur est mis en place.

L'échantillon protéique dont la densité est augmentée par adjonction de saccharose, est teinté par une microgoutte de solution aqueuse de bleu de bromophénol ; ce colorant migre avec le front mobile et permet de suivre la migration.

Le générateur utilisé permet de maintenir l'intensité constante malgré les variations de résistance qui se produisent dans la cellule d'électrophorèse, car la résistance du gel augmente en cours d'analyse.

On affiche un milliampère par colonne de gel ; les protéines migrent librement en milieu liquide et se concentrent à l'interface gel-liquide. On affiche alors 2,5 milliampères par colonne et l'on arrête l'électrophorèse lorsque le ménisque de bleu de bromophénol atteint la marque tracée sur le tube de verre.

Avec la cellule d'origine, nous devions arrêter toutes les électrophorèses en même temps alors que les fronts colorés sont souvent fixés à des hauteurs variables, rendant difficile la comparaison des électrophorégrammes.

En effet, les volumes d'extraits déposés sur les colonnes de migration sont souvent différents les uns des autres ; plus le volume est grand, plus les protéines acquièrent un certain retard dans leur migration.

D'autre part, les extraits ont souvent des forces ioniques différentes ; plus la force ionique de l'échantillon est élevée, plus le champ est faible à son niveau ; il en résulte un retard parfois très important dans la migration de tels échantillons. La modification apportée à la cellule permet de retirer les tubes de migration dès que la longueur de migration désirée est atteinte et de poursuivre sans inconvénient les électrophorèses restantes jusqu'au moment où le retrait d'un autre tube est nécessaire. L'interruption du courant, très brève, ne perturbe en rien les migrations.

Après la migration, les gels sont immédiatement extraits des tubes de verres et colorés au noir amide ou au Coomassie (Coomassie brillant Blue R 250).

Les gels colorés au noir amide sont placés pendant une heure dans une solution à 0,5 % de noir amide dans l'acide acétique à 7 % puis décolorés par électrophorèse transversale.

Les gels colorés au Coomassie sont tout d'abord fixés dans une solution aqueuse d'acide sulfosalicylique à 20 % pendant 18 heures puis immergés dans une solution aqueuse de Coomassie à 0,25 % pendant 3 heures et décolorés dans une solution d'acide acétique à 7 % (cinq bains de 30 minutes).

Les électrophorégrammes sont conservés dans une solution d'acide acétique à 7 %.

L'estimation de l'importance relative des fractions se fait par densitométrie en transmission à l'aide du Chromoscan, muni d'un objectif de microscope 20x placé entre l'échantillon et le photomultiplicateur. La fente employée est très fine (0,3 x 1 mm). Les filtres utilisés sont des filtres de bandes : rouge, centré sur 620 nm, pour le noir amide et vert, centré sur 541 nm, pour le Coomassie.

3) Electrophorèse sur Cellogel RS

Le Cellogel RS*, acétate de cellulose gélatineux, possédant une porosité et un degré de gélatinisation particuliers, nous paraissait suscep-

* Sebia - 3, boulevard Exelmans - 75 - Paris 16ème

tible de fractionner convenablement les protéines solubles des extraits de muscles adducteurs de Lamellibranches.

De nombreux essais préliminaires ont confirmé la rapidité de la technique et son pouvoir de résolution élevé. Nous l'avons appliquée aux extraits musculaires de cinq espèces d'huîtres.

Nous avons utilisé des bandes de Cellogel RS "triangulaires" de 5 cm de largeur avec une longueur limitée à 20 cm. Conservées dans une solution de méthanol à 30 %, ces bandes sont prélevées au moment de l'emploi, essorées et immergées pendant 2 h 30 dans le tampon tris-glycine de formule :

tris	3	g
glycine	14,4	g
eau distillée	q.s.p. 1000	ml

Elles sont placées dans une cuve d'électrophorèse de Kohn, surface absorbante au-dessus et découpe triangulaire du côté cathodique. Le pont d'électrophorèse est de 16 cm ; du papier Whatman 3 MM assure la jonction entre les bandes et le tampon.

A l'aide d'un capillaire calibré, nous avons déposé au niveau de l'étranglement de la bande, 55 à 65 μ l d'extrait, préparé suivant le protocole habituel et correspondant à 300 μ g de protéines.

L'électrophorèse est conduite pendant 2 h 15 sous 230 volts, à tension constante. L'intensité demeure toujours inférieure à 0,15 mA/cm.

La fixation et la coloration sont réalisées par immersion de 30 minutes dans un bain de noir amide en solution dans le méthanol et l'acide acétique de formule :

noir amide	1	g
méthanol	100	ml
acide acétique cristallisable	20	ml
eau distillée	q.s.p. 200	ml

La décoloration est opérée pendant le même temps dans quatre bains successifs de la solution :

méthanol	500	ml
acide acétique cristallisable	100	ml
eau distillée	q.s.p. 1000	ml

Les électrophorégrammes sont conservés dans une solution d'acide acétique à 5 %, après passage dans une solution d'acide acétique à 10 %.

Les profils densitométriques sont obtenus par réflexion à 620 nm à l'aide du Chromoscan.

D - MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE

Les Mollusques Lamellibranches étudiés, nous l'avons déjà indiqué, sont des monomyaires (Ostreidae et Pectinidae) ou des dimyaires.

Ostreidae

. *Ostrea edulis* Linné, huître plate européenne que l'on trouve sur tout le rivage atlantique ; âge : 3 à 4 ans environ ;

. *Crassostrea angulata* Lamarck, huître portugaise, répartie sur toutes nos côtes ; âge : 4 ans ;

. *Crassostrea gigas* Thunberg, huître japonaise ou huître du Pacifique, originaire du Japon, cultivée en France. Nous avons pu obtenir à la Tremblade des huîtres de 4 ans dont les extraits ont pu être comparés à ceux préparés ultérieurement avec des huîtres âgées de 10 mois (101).

. *Crassostrea gasar* Adanson, huître africaine de Gambie provenant de Joal, République du Sénégal. La coquille large et plate avec des tons oranges par endroits, porte souvent sur la valve inférieure des empreintes de racines d'arbres sur lesquels se fixent ces huîtres. Elles ont été transportées par avion de Dakar et nous avons pu les traiter dès leur arrivée. Le temps d'émersion a été analogue à celui des espèces indigènes étudiées.

. *Crassostrea virginica* Gmelin, huître de la côte atlantique de l'Amérique du Nord. Les huîtres étudiées, provenant de Gardiners Bay, Long Island U.S.A., avaient été entreposées cinq mois dans un bassin d'élevage à Plouharnel *. Age : 4 ans.

* Ces huîtres nous avaient été procurées par les soins de l'I.S.T.P.M. qui les avait entreposées dans un bassin d'élevage appartenant au département scientifique de la Compagnie Générale Transatlantique.

TABLEAU I - CARACTERISTIQUES DES EXTRAITS

date de préparation	Espèces étudiées	Origine géographique	Nombre d'animaux utilisés	Poids moyen d'un individu	Poids de muscles traités			Ml d'extrait obtenu		teneur en prot.solubles P.T. P.N.
					M.T.	P.T.	P.N.	P.T.	P.N.	
28- 3-66	<i>Tapes decussatus</i>	Noirmoutier	12	30 g	5,5 g					
28- 3-66	<i>Mytilus edulis</i>	Pénestin	26	10 g	2,5 g					
30- 3-66	<i>Mya arenaria</i>	Saint Brévin les Pins	10	90 g	7 g					
27-11-69	<i>Anodonta cygnea</i>	Vihiers	3	218 g	6,4 g					
23- 2-70	<i>C. angulata</i>	Beauvoir	45	48 g		13,2 g				3,6
19- 3-70	<i>C. angulata</i>	Marennes	60	102 g		27,2 g				6,7
9- 4-70	<i>C. angulata</i>	Marennes	48	106,5 g		16,25 g		25,25		4,75
15- 4-70	<i>O. edulis</i>	Locmariaquer	23	97,4 g		15,9 g		30		
2-10-70	<i>C. angulata</i>	Beauvoir	24	60,5 g		6,2 g		13,5		
7-11-70	<i>Pecten maximus</i>	Roscoff	1	329 g		16,8 g		29,5		2,6
	<i>Chlamys varius</i>	Roscoff	7	27,4 g		15,2 g		26,5		1,9
3-12-70	<i>C. angulata</i>	Marennes	29	80 g		11,6 g		26		4,94
18- 1-71	<i>C. gasar</i>	Joal	24	76 g		7,1 g		13,7	5,5	4,8
2- 3-71	<i>C. angulata</i>	Marennes	99	73,2 g		28,7 g		62,2	14	4,8
16- 3-71	<i>O. edulis</i>	Locmariaquer	37	85 g		28,5 g		61,5	14,1	3,4
16- 3-71	<i>Pecten maximus</i>		1	285 g		29,3 g				
30- 3-71	<i>C. virginica</i>	U.S.A. Plouharnel	21	105 g		10 g		23,2	12	5,1
28- 4-71	<i>C. gigas</i>	La Tremblade	33	254 g		32,1 g		68	17,6	4,9
7-12-71	<i>O. edulis</i>	Locmariaquer	36	83 g		19,3 g		36,4	13,6	4,08
11- 1-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	36	76,5 g		17,9 g		37	6,5	3,86
18- 1-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	12	74,4 g		5,75 g		11,1	1,85	4,25
25- 1-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	12	75,3 g		6,2 g		13,5	2,2	3,52
15- 2-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	6	69 g		3,65 g		7,4		5,83
29- 2-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	12	115,5 g		9,5 g		21	4,8	3,60
7- 3-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	12	111 g		9,8 g		19,2	6,7	4,33
14- 3-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	7	100,7 g		5,65 g		9,5	2,8	4,70
21- 3-72	<i>C. angulata</i>	Marennes	7	105,3 g		5,65 g		10	2,9	4,45

M.T. Muscle Total - P.T. Partie Transparente - P.N. Partie Nacrée

Nous avons donc pu comparer quatre espèces de *Crassostrea* à une seule espèce d'*Ostrea*. Les âges indiqués sont évidemment approximatifs.

Sur la planche hors-texte I, la photographie 1 illustre l'aspect extérieur des cinq espèces d'huîtres citées. La coquille de l'*Ostrea* diffère de celles des *Crassostrea* très analogues entre elles. La photographie 2 illustre bien le caractère de gigantisme de l'huître japonaise.

Autres Lamellibranches monomyaires

Nous avons étudié deux Pectinidae, la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* L., bivalve bien connu et le pétoncle, *Chlamys varius* L., bivalve de plus petite taille, également connu dans notre région atlantique et qu'on peut facilement se procurer.

Lamellibranches dimyaires

Nous avons étudié des dimyaires marins : la mye, *Mya arenaria* L., la moule, *Mytilus edulis* L. et la palourde, *Tapes decussatus* L. et un dimyaire d'eau douce, l'anodonte, *Anodonta cygnea* L.

Nous rappelons que nos études ont porté sur le muscle postérieur qui correspond au muscle conservé dans l'évolution ontogénétique et phylogénétique des Ostreidae.

E - RESULTATS

Dans le tableau I, nous avons groupé tous les renseignements concernant les animaux : leur origine, leur nombre, leur poids moyen, les poids de muscle traité, la date de préparation des extraits et leur teneur en protéines solubles.

1) Résultats obtenus par chromatographie en couche mince de gel de Sephadex

La figure 7 et la photographie 9 de la planche hors-texte III présentent les chromatogrammes des parties transparentes des cinq huîtres

étudiées. Des volumes de 4,2 µl à 4,6 µl d'extraits ont été déposés ; le bleu dextran placé à gauche et à droite de la plaque sert d'indicateur de migration.

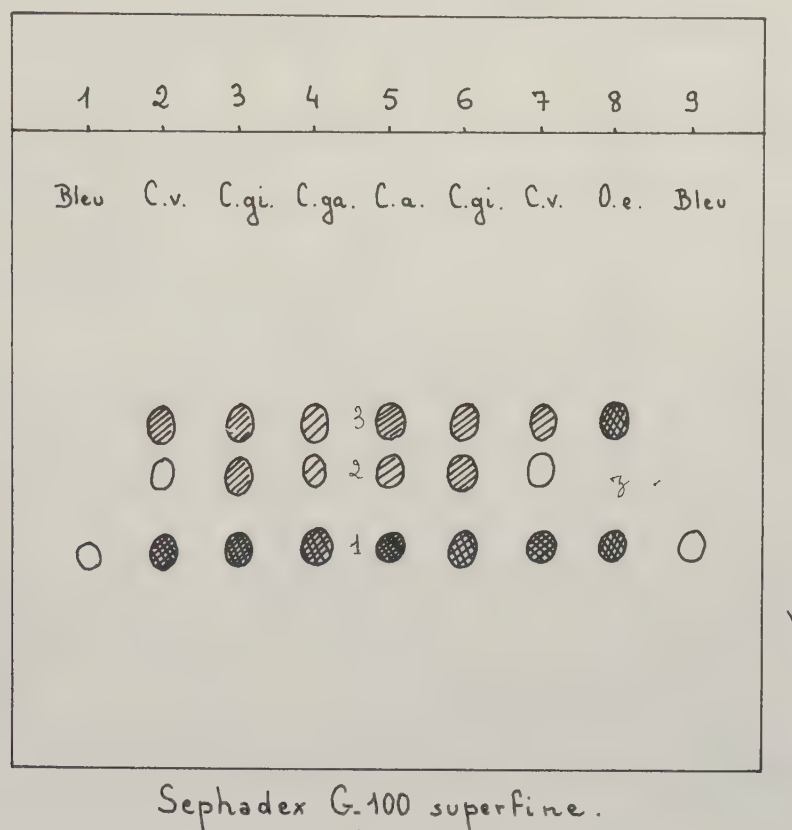


Figure 7 - Chromatogrammes en couche mince d'extraits de la partie transparente du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* (C.a.), *Crassostrea gigas* (C.gi.), *Crassostrea gasar* (C.ga.), *Crassostrea virginica* (C.v.), *Ostrea edulis* (O.e.)

L'extrait d'huître portugaise, placé en position 5 donne trois taches 1, 2 et 3 ; la tache 1, la plus intense, est formée de protéines exclues, de haut poids moléculaire, la tache 2, la plus faible en intensité, comporte les protéines de poids moléculaires moyens et la tache 3 qui migre plus lentement contient des protéines de faibles poids moléculaires.

L'extrait d'huître japonaise, placé en position 3 et 6 donne trois taches situées au même niveau que celles de l'huître portugaise, la tache 2 cependant présente ici une coloration plus intense.

Pour l'extrait d'huître africaine, placé en position 4, on observe trois taches ; la tache 2 et surtout la tache 3 sont plus faibles que pour les taches homologues de l'huître portugaise.

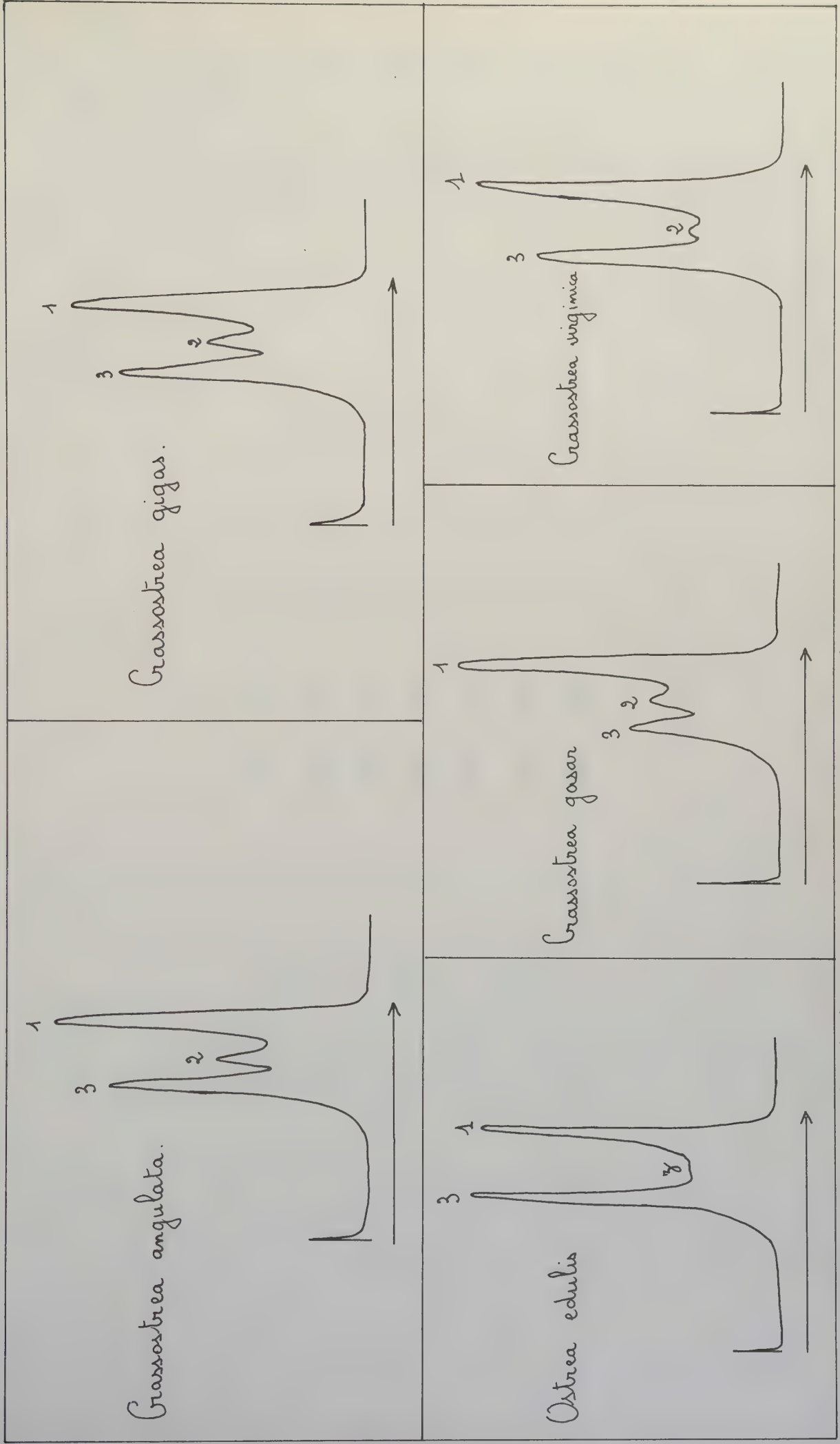


Figure 8 - Enregistrements densitométriques des chromatogrammes de la figure 7

L'extrait d'huître américaine, en position 2 et 7, donne une tache 2 très peu marquée.

Quant à l'extrait d'huître plate, en position 8, il est caractérisé par l'absence de tache 2 ; une zone Z légèrement colorée relie les taches 1 et 3.

Les densitométries de ces chromatogrammes sont présentées sur la figure 8 ; elles mettent en évidence les différences déjà signalées. Nous observons notamment un faible pic III correspondant à la tache 3 pour *C. gasar* et un faible pic II correspondant à la tache 2 pour *C. virginica*.

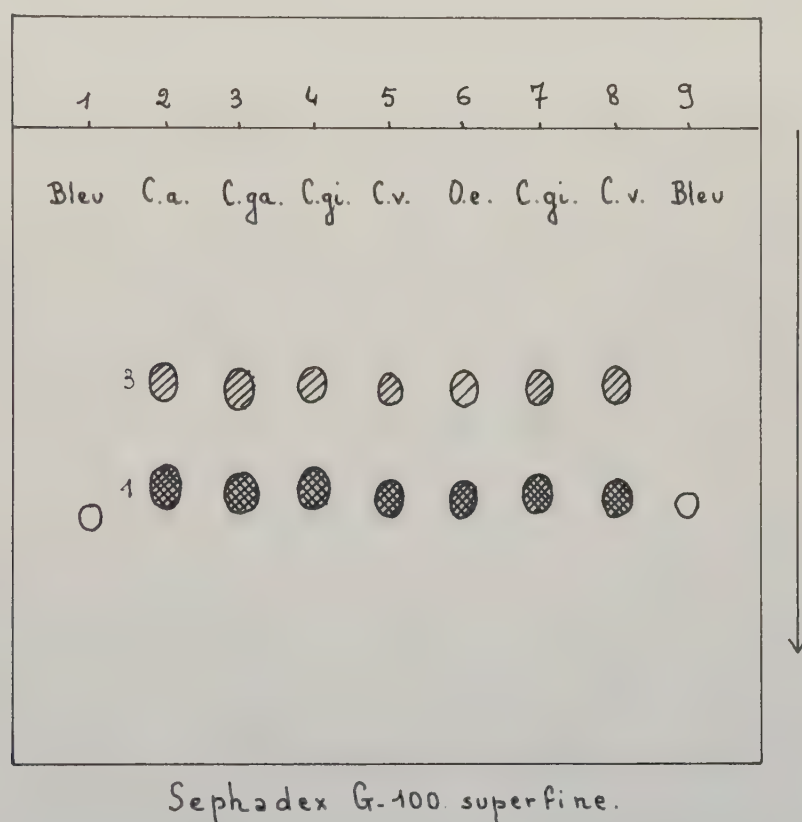


Figure 9 - Chromatogrammes en couche mince d'extraits de la partie nacrée du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* (C.a.), *Crassostrea gigas* (C.gi.), *Crassostrea gasar* (C.ga.), *Crassostrea virginica* (C.v.) et *Ostrea edulis* (O.e.)

La figure 9 et la photographie 10 de la planche hors-texte III représentent les chromatogrammes des parties nacrées des cinq espèces d'huîtres : nous pouvons noter une grande ressemblance entre ces chromatogrammes. Tous présentent deux taches, une tache 1 très intense correspondant aux pro-

téines exclues et une tache 3 d'intensité moyenne. Les intensités de coloration de cette tache 3 sont très voisines pour les *Crassostrea*, celle d'*Ostrea* est nettement plus faible. Il faut remarquer l'absence de tache 2 sur tous les chromatogrammes de partie nacrée.

En ce qui concerne les Pectinidae, la chromatographie en couche mince de la partie transparente du muscle de la coquille Saint-Jacques montre deux taches, une tache exclue et une tache située au niveau de la tache 2 de l'huître.

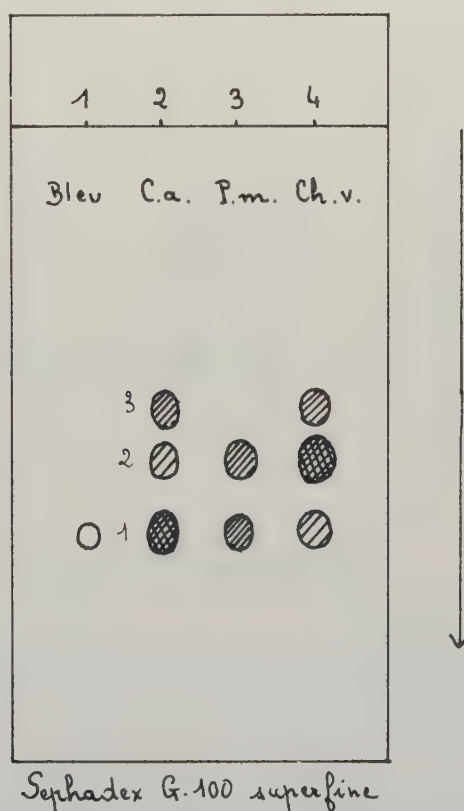


Figure 10 - Chromatogrammes en couche mince d'extraits de la partie transparente du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* (C.a.), *Pecten maximus* (P.m.) et *Chlamys varius* (Ch.v.)

La chromatographie sur plaque de l'extrait de pétoncle présente trois taches, que nous trouvons au même niveau que celles des huîtres, la tache 2 est particulièrement importante. La figure 10 réunit les migrations de ces deux extraits comparées avec celui de l'huître portugaise.

En ce qui concerne les dimyaires, la figure 11 schématise une migration d'extrait musculaire d'anodonte avec une migration d'extrait d'huître japonaise pour comparaison. L'anodonte présente deux taches : une tache, la plus colorée, est exclue, l'autre est située au niveau de la tache 3 de l'huître.

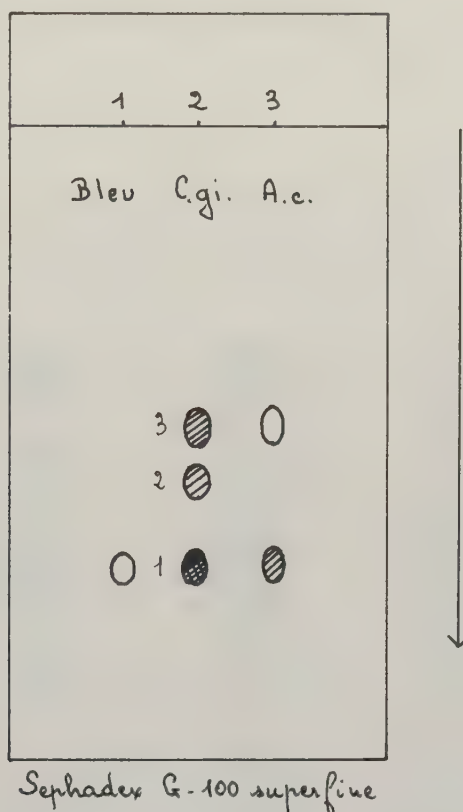


Figure 11 - Chromatogrammes en couche mince d'extraits de la partie transparente de *Crassostrea gigas* (C.gi.) et du muscle total d'*Anodonta cygnea* (A.c.)

2) Résultats obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide met en évidence un grand nombre de fractions pour chaque espèce.

Les électrophorégrammes présentés en figure 12 et sur la photographie 11 de la planche hors-texte III correspondent à des migrations d'extraits de parties transparentes du muscle des cinq espèces d'huîtres étudiées.

Nous avons déposé sur chaque colonne de gel, 160 µg de protéines, la coloration au noir amide révèle un certain nombre de bandes. Pour faciliter

l'exploitation des résultats, nous séparons ces électrophorégrammes en trois zones :

- une zone rapide, *r*, occupant la moitié de la migration ; elle comprend des bandes très fines qui sont les plus rapides et une à trois bandes intenses particulièrement "caractéristiques".

- une zone intermédiaire, *i*, possédant en son milieu une ou deux bandes très colorées, encadrées de bandes fines.

- une zone lente, *l*, comportant 2 à 5 bandes fines. Cette zone est limitée vers le bas par une bande intense et vers le haut par une bande exclue.



Figure 12 - Electrophorégrammes en gel de polyacrylamide d'extraits de la partie transparente du muscle adducteur de *Ostrea edulis* (O.e.), *Crassostrea angulata* (C.a.), *Crassostrea gigas* (C.gi.), *Crassostrea gasar* (C.ga.) et *Crassostrea virginica* (C.v.)

Ces électrophorégrammes comprennent 16 à 22 fractions suivant les espèces.

L'aspect électrophorétique de l'extrait d'*Ostrea edulis* est différent de celui des *Crassostrea*, tant par le nombre réduit de fractions de la zone rapide que par leur disposition.

Les électrophorégrammes de *C. angulata* et *C. gigas* présentent dans la zone rapide les trois bandes caractéristiques, déjà signalées précédemment (101), ils ont une grande similitude. Les fractions ont la même mobilité mais chez *C. angulata* existent deux bandes supplémentaires, l'une dans la zone intermédiaire et l'autre dans la zone rapide.

Les électrophorégrammes de *C. gasar* et *C. virginica* diffèrent nettement entre eux et de ceux de *C. angulata* et *C. gigas* ; nous pouvons noter en particulier les bandes intenses caractéristiques de la zone rapide qui n'ont pas les mêmes mobilités.

La figure 13 réunit les profils densitométriques des divers électrophorégrammes ; les différences signalées apparaissent nettement si l'on considère les zones rapides ; seules *C. angulata* et *C. gigas* présentent des similitudes entre elles ; on observe cependant des différences quantitatives au niveau des trois bandes caractéristiques ; chez l'huître portugaise, on observe une bande intense encadrée de deux bandes plus faibles, tandis que chez l'huître japonaise, on a deux bandes intenses précédées d'une bande faible. Cette particularité avait déjà été notée dans le travail de P. MORE mais concernait des huîtres japonaises de 10 mois.

Pour parfaire les comparaisons entre les diverses huîtres, nous avons fait migrer les extraits deux à deux sur une même colonne de gel, selon la méthode de CLARKE (29). L'extrémité supérieure du tube de migration, qui sert de réservoir à l'échantillon, est divisée en deux par une petite bande de bristol préalablement paraffinée et enfoncée d'un millimètre dans le gel. Les dépôts se font de part et d'autre de la cloison ainsi formée.

La photographie 12 de la planche hors-texte III représente de telles migrations. A côté de l'huître portugaise, nous avons fait migrer en parallèle l'une ou l'autre des *Crassostrea*. Les analogies et les différences sont bien nettes, notamment en ce qui concerne les bandes caractéristiques de la zone rapide.

Nous présentons sur la figure 14 les électrophorégrammes des parties nacrées des cinq espèces d'huîtres.

Nous distinguons comme pour les parties transparentes, une zone rapide, *r*, une zone intermédiaire, *i*, une zone lente, *l*. Les bandes les plus intenses se rencontrent dans les zones intermédiaires et lentes alors que pour les parties transparentes elles se situaient dans les trois zones, les

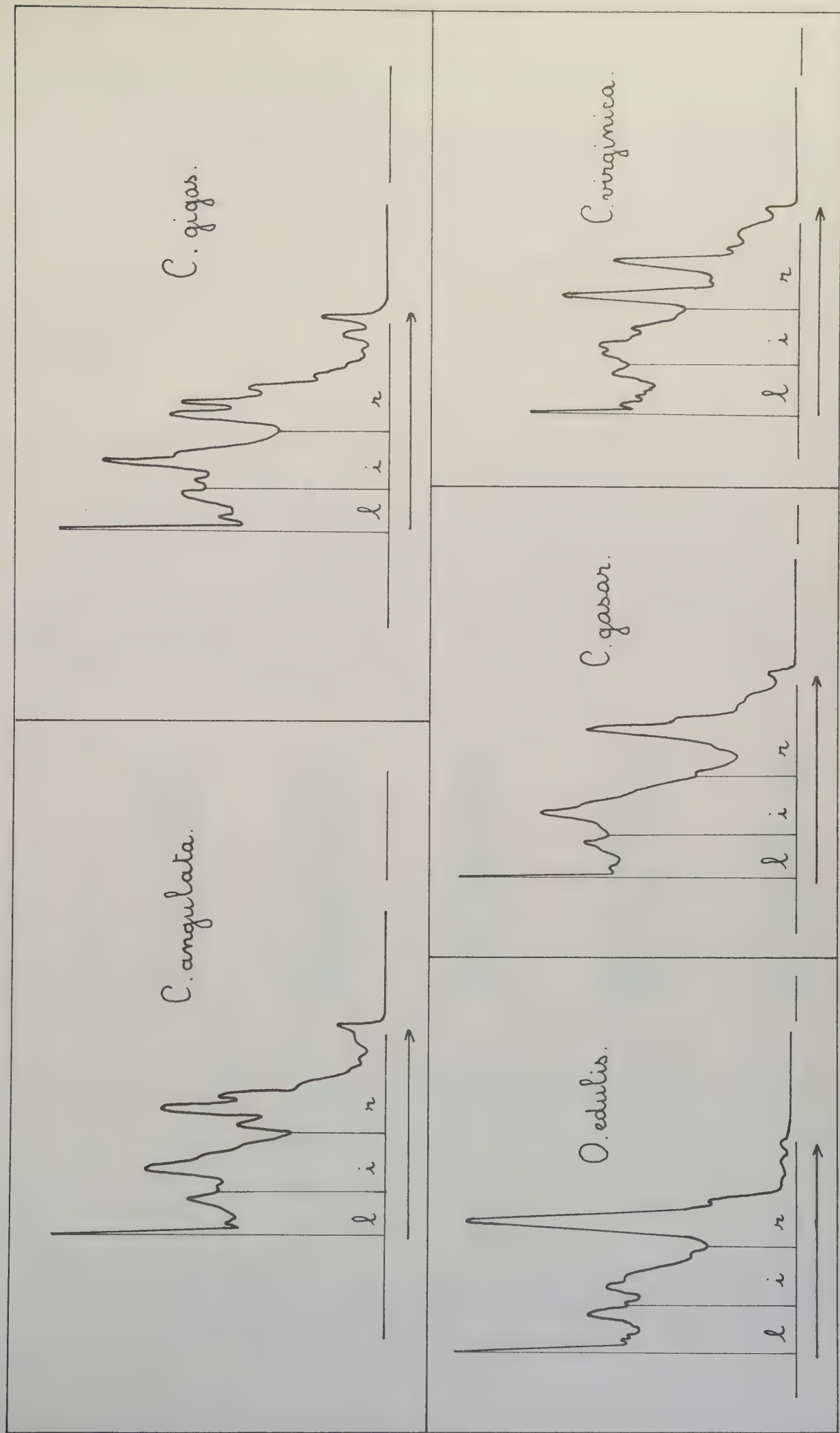


Figure 13 - Profils densitométriques des électrophorégrammes de la figure 12 et de la photographie 11 de la planche hors texte III

plus caractéristiques étant dans les zones rapides.

Pour *O. edulis*, la répartition des fractions est différente de celle des *Crassostrea* et la plupart des fractions de la zone rapide ont une très faible intensité.

Les électrophorégrammes de *C. angulata* et *C. gigas* présentent entre eux une similitude encore plus importante que pour la partie transparente, puisque seulement une fraction de la zone intermédiaire a une coloration plus prononcée au noir amide chez l'huître japonaise.

En ce qui concerne *C. gasar* et *C. virginica*, la disposition des fractions est spécifique de chacune des deux espèces et différente de celle de *C. angulata* et de *C. gigas*. On note, en particulier, chez *C. virginica*, dans la partie cathodique de la zone intermédiaire, une large bande intense que ne possèdent pas les autres *Crassostrea* étudiées. Sur le tableau II, nous indiquons pour chaque espèce et selon les zones, le nombre de fractions décelables par les colorants. Ce nombre est sensiblement le même pour les cinq espèces ; la coloration au Coomassie révèle des fractions que le noir amide ne permet pas de mettre en évidence.

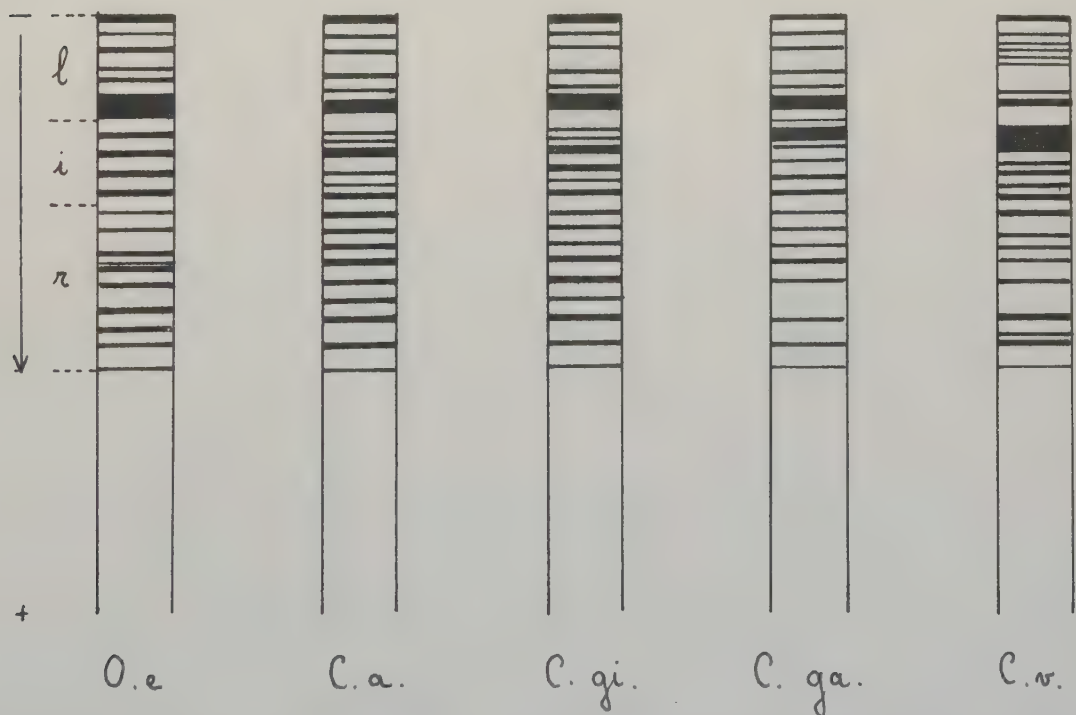


Figure 14 - Electrophorégrammes en gel de polyacrylamide d'extraits de la partie nacrée du muscle adducteur de *Ostrea edulis* (O.e.), *Crassostrea angulata* (C.a.), *Crassostrea gigas* (C.gi.), *Crassostrea gasar* (C.ga.) et *C. virginica* (C.v.)

TABLEAU II

Nombre et répartition des fractions électrophorétiques
détectables par le noir amide (N.A.) et le Coomassie (C.)

	O.e.		C.a.		C.gi.		C.ga.		C.v.	
	N.A.	C.	N.A.	C.	N.A.	C.	N.A.	C.	N.A.	C.
<i>l</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	7	8
<i>i</i>	4	4	5	6	5	6	6	6	5	5
<i>r</i>	7	10	7	9	7	9	8	8	7	9
Total	17	20	18	21	18	21	20	20	19	22

Les profils densitométriques des différents électrophorégrammes sont reproduits sur la figure 15.

Nous avons également fait migrer les extraits de parties nacrées deux à deux sur une même colonne de gel, selon la méthode de CLARKE. La figure 16 schématise les migrations obtenues. Une grande similitude apparaît dans le tube 1 entre les extraits de *C. angulata* et *C. gigas*.

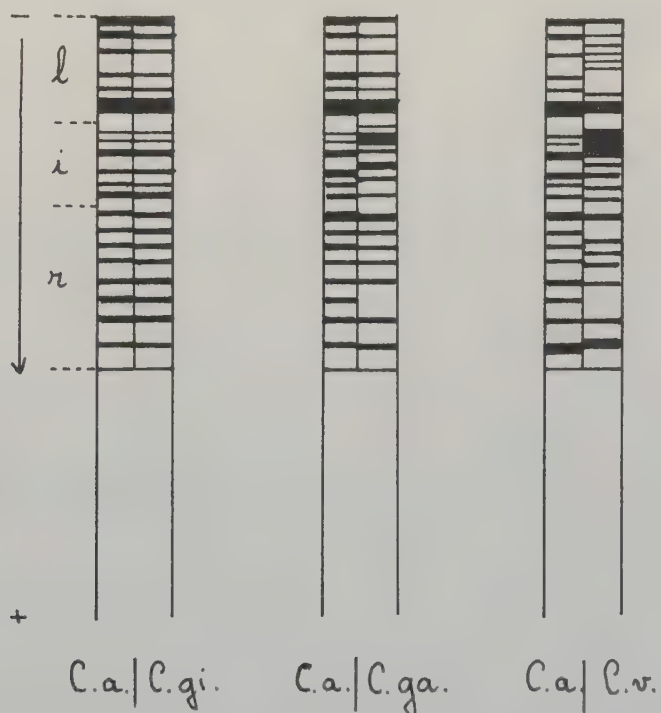


Figure 16 - Electrophorégrammes de deux extraits différents de parties nacrées migrant sur une même colonne de gel.

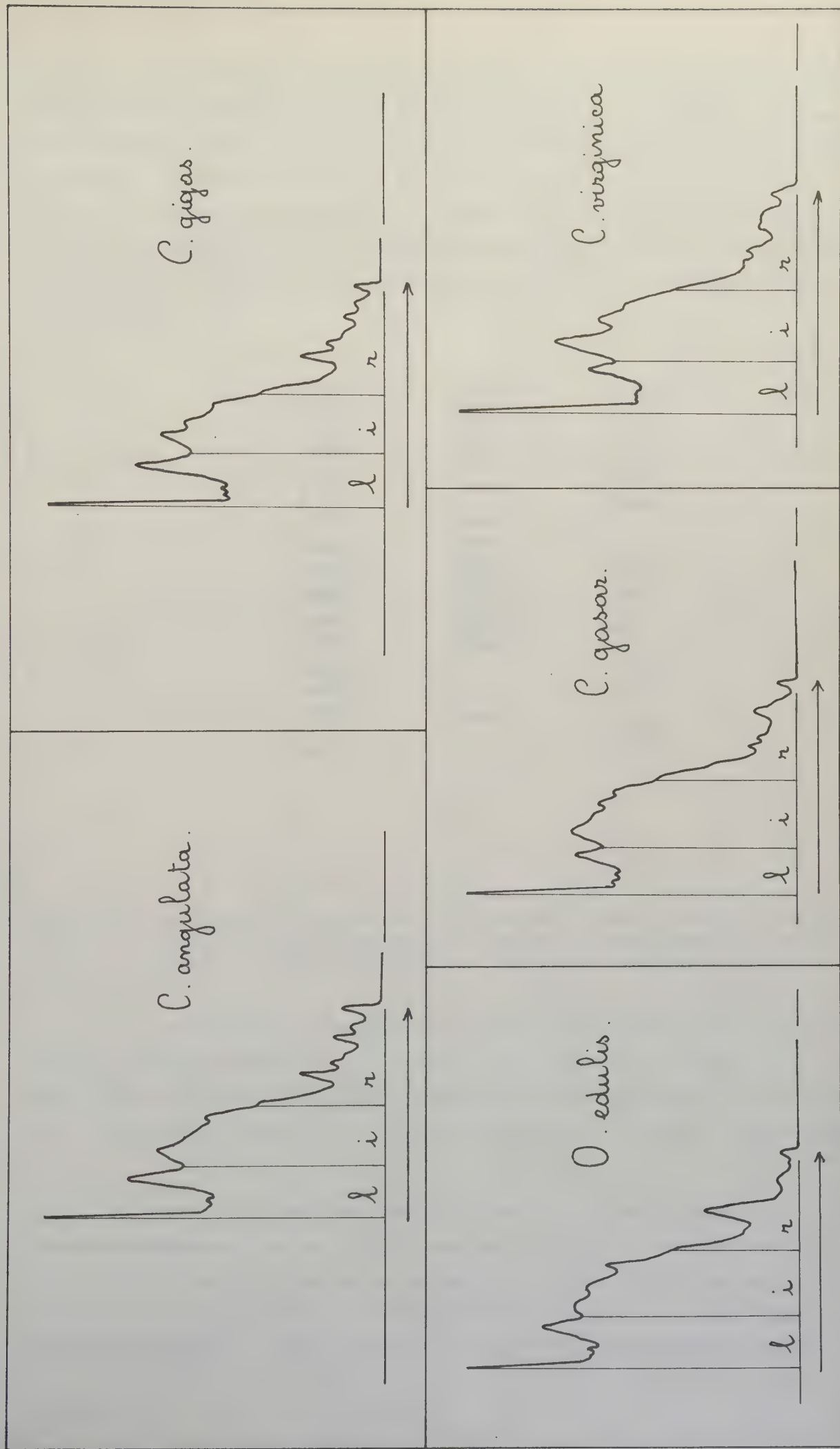


Figure 15 - Profils densitométriques des électrophorégrammes de la figure 14

En ce qui concerne les Pectinidae, les électrophorèses en gel de polyacrylamide révèlent un grand nombre de fractions. La figure 17 schématise les bandes obtenues : à gauche, un extrait d'huître portugaise comme référence, au centre, l'extrait de pétoncle et à droite celui de la coquille Saint-Jacques. Le pétoncle présente peu de bandes très rapides mais des bandes très intenses au niveau des bandes caractéristiques de l'huître ; la zone intermédiaire contient seulement trois bandes, par contre, la zone lente en a un grand nombre.

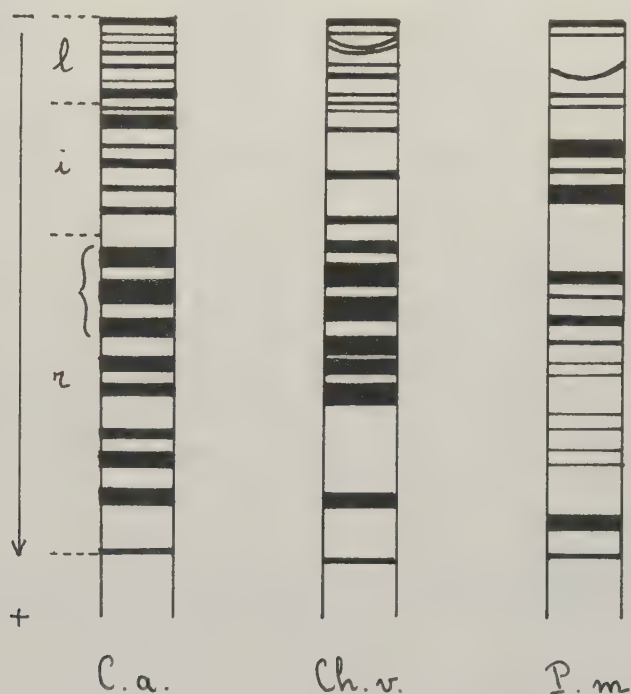


Figure 17 - Electrophorégrammes en gel de polyacrylamide d'extraits de la partie transparente du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* (C.a.), *Chlamys varius* (Ch.v.) et *Pecten maximus* (P.m.)

La coquille Saint-Jacques possède peu de bandes dans la zone rapide : quelques fractions très rapides sont de faible intensité, celles qui sont situées au niveau des bandes caractéristiques de l'huître sont peu colorées ; les zones intermédiaire et lente renferment des bandes très intenses.

En ce qui concerne les dimyaires, la figure 18 représente les électrophorégrammes des extraits de muscles postérieurs de la moule, de la mye, et de la palourde. Le nombre de bandes est moins élevé que pour les huîtres et la disposition est très différente. L'extrait de moule comprend des bandes réparties tout au long de la migration, la mye également, avec

quelques bandes rapides intenses. La palourde comporte une bande très colorée vers le milieu de la migration et les bandes lentes sont assez importantes.

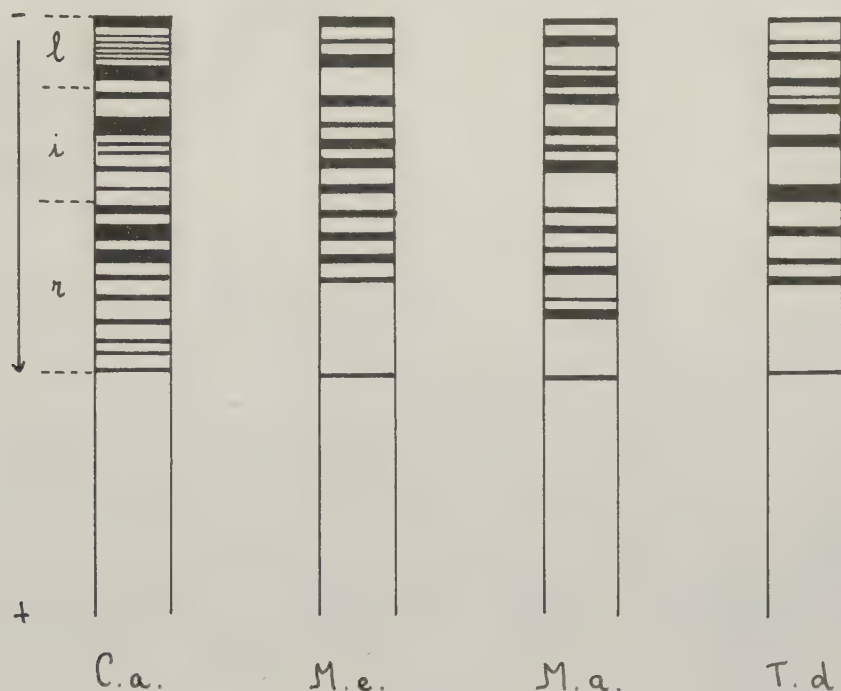


Figure 18 - Electrophorégrammes en gel de polyacrylamide d'extraits de muscle adducteur entier de *Crassostrea angulata* (C.a.), *Mytilus edulis* (M.e.), *Mya arenaria* (M.a.) et *Tapes decussatus* (T.d.)

3) Résultats obtenus par électrophorèse sur Cellogel RS

Sur les électrophorégrammes que nous présentons sur la photographie 13 de la planche hors-texte IV, la séparation des fractions protéiques est échelonnée tout au long des bandes dont le nombre, l'importance et la place respectives permettent une bonne identification faisant apparaître des analogies et des différences selon les espèces.

L'électrophorégramme d'*Ostrea edulis* comporte une bande très nettement colorée avec, de part et d'autre, des bandes beaucoup moins importantes ; ceux de *C. angulata* et de *C. gigas* présentent la même bande nette, légèrement décalée, avec, de part et d'autre, des bandes beaucoup plus nombreuses, particulièrement apparentes vers la cathode.

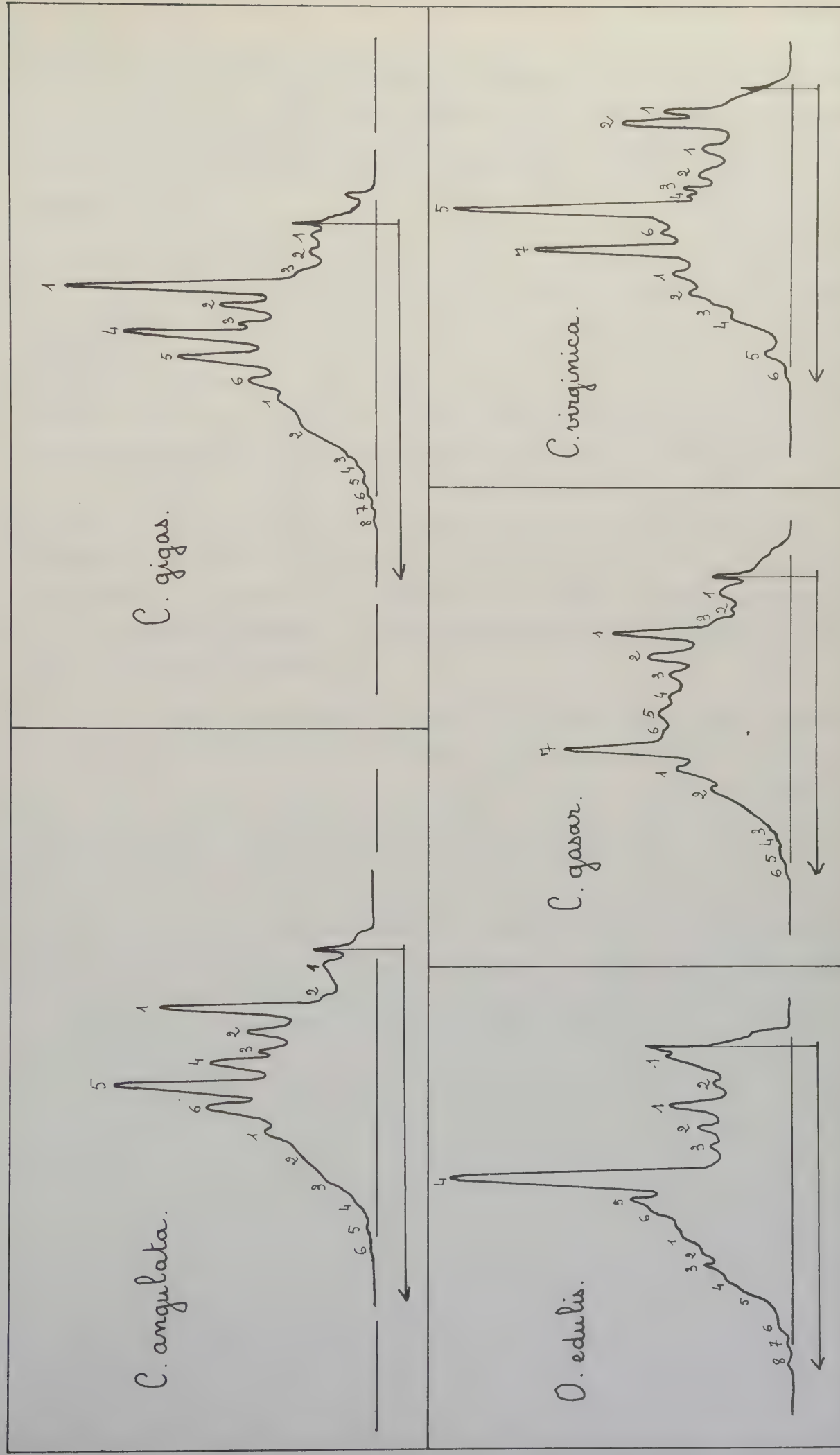


Figure 19 - Profils densitométriques des électrophorégrammes présentés sur la photographie 13 de la planche hors texte IV

Pour ces trois espèces, ces résultats sur Cellogel RS confirment les analogies et les différences constatées par P. MORE (101) en électrophorèse sur acétate de cellulose ordinaire et en gel de polyacrylamide ; en particulier, on retrouve la constance des bandes caractéristiques des deux genres.

Pour *C. gasar*, une bande très colorée, de migration assez rapide, est caractéristique ; elle est entourée d'autres bandes comme pour les autres *Crassostrea* précitées . Par contre, sur l'électrophorégramme de *C. virginica*, on observe deux bandes intenses dont l'une possède une mobilité électrophorétique beaucoup moins grande et diverses petites bandes de part et d'autre, certaines à mobilité très faible restent dans la partie triangulaire.

Les analogies et les différences observées sur les électrophorégrammes des diverses espèces de *Crassostrea* apparaissent encore mieux sur les profils densitométriques présentés sur la figure 19. Nous avons numéroté les six bandes situées dans la partie cathodique de la migration, en-dessous de la découpe triangulaire.

Pour *C. angulata* et *C. gigas*, ces bandes sont situées au même niveau mais l'intensité diffère suivant l'espèce. Les bandes 4 et 6 sont plus faibles que la bande 5 chez *C. angulata*, tandis que ces trois bandes sont d'intensité décroissante chez *C. gigas*. De plus, les bandes les plus rapides, qui sont très faibles, sont plus nombreuses pour *C. gigas*.

Pour les autres espèces, on constate de très nettes différences. Une forte bande 7, assez rapide, apparaît pour *C. gasar*, deux bandes intenses, 5 et 7, à mobilité électrophorétique moins grande, sont observées pour *C. virginica* ; la mobilité de la bande 5 étant nettement plus faible que celle de *C. gasar*.

D E U X I E M E P A R T I E

ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide a montré la nature hétérogène des extraits protéiques étudiés et a permis de localiser certaines fractions qui nous ont paru particulièrement intéressantes. Nous avons cherché à utiliser l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide pour isoler ces fractions.

Mais à l'expérience, les extraits protéiques des muscles adducteurs sont apparus beaucoup trop complexes pour envisager directement le fractionnement préparatif. Il est nécessaire de pratiquer un fractionnement primaire. Dans ce but, nous avons choisi la chromatographie d'exclusion-diffusion en colonnes de gel de Sephadex.

L'électrophorèse préparative n'a été appliquée qu'à la fraction chromatographique la plus constante et la plus caractéristique des protéines solubles. Elle conduit à des sous-fractions dont l'homogénéité et la pureté seront contrôlées par l'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide.

Nous exposerons d'abord la méthode d'électrophorèse préparative adoptée.

A - METHODE ADOPTEE

1) Principe de la méthode

Dans une colonne de gel de polyacrylamide verticale* reliée à deux réservoirs de tampon : un anodique et un cathodique, il est possible de fractionner par électrophorèse un mélange protéique, d'éluer au fur et à mesure les diverses fractions et de les recueillir.

Pour séparer correctement les fractions et pour éviter leur mélange au cours de l'élution, les gels et les appareils doivent répondre à un certain nombre de critères qui sont les suivants :

- les gels de polyacrylamide ne doivent ni gonfler, ni se rétracter de façon importante,
- la géométrie de l'appareil doit permettre l'évacuation rapide des calories,
- le volume de la chambre d'élution doit être aussi réduit que possible,
- l'élution doit être homogène et continue.

2) Appareillage

De nombreux appareils préparatifs, plus ou moins complexes, ont été réalisés par LEWIS et CLARK (83), JOVIN, CHRAMBRACH et NAUGHTON (67), MAIZEL (90), RACUSEN et CALVANICO (133), HJERTEN, JERSTEDT et TISELIUS (62), DUESBERG et RUECKERT (44), GORDON et LOUIS (56), SMITH et MOSS (152), BROWNSTONE (17), HJERTEN, JERSTEDT et TISELIUS (63).

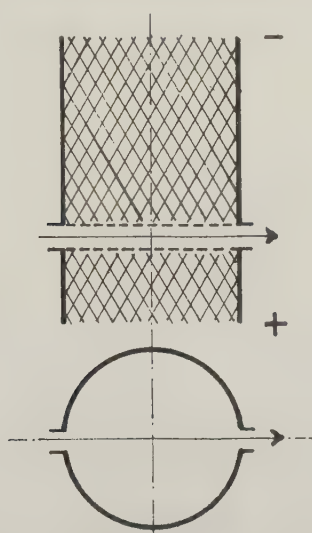
Ils comportent :

- des colonnes généralement cylindriques, plus rarement de section rectangulaire,

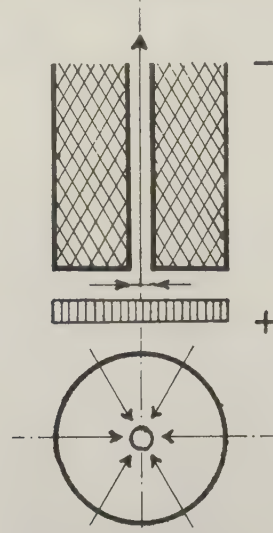
* Il existe une méthode d'électrophorèse préparative en plaque de gel de polyacrylamide horizontale que nous citons pour mémoire (6).

- le plus souvent un dispositif permettant de refroidir les gels extérieurement et intérieurement; ainsi les gels coulés dans des colonnes cylindriques présentent une section annulaire,

- des chambres d'élution à volume fixe ou variable,
- un système assurant une élution transversale ou radiale,



Elution transversale



Elution radiale

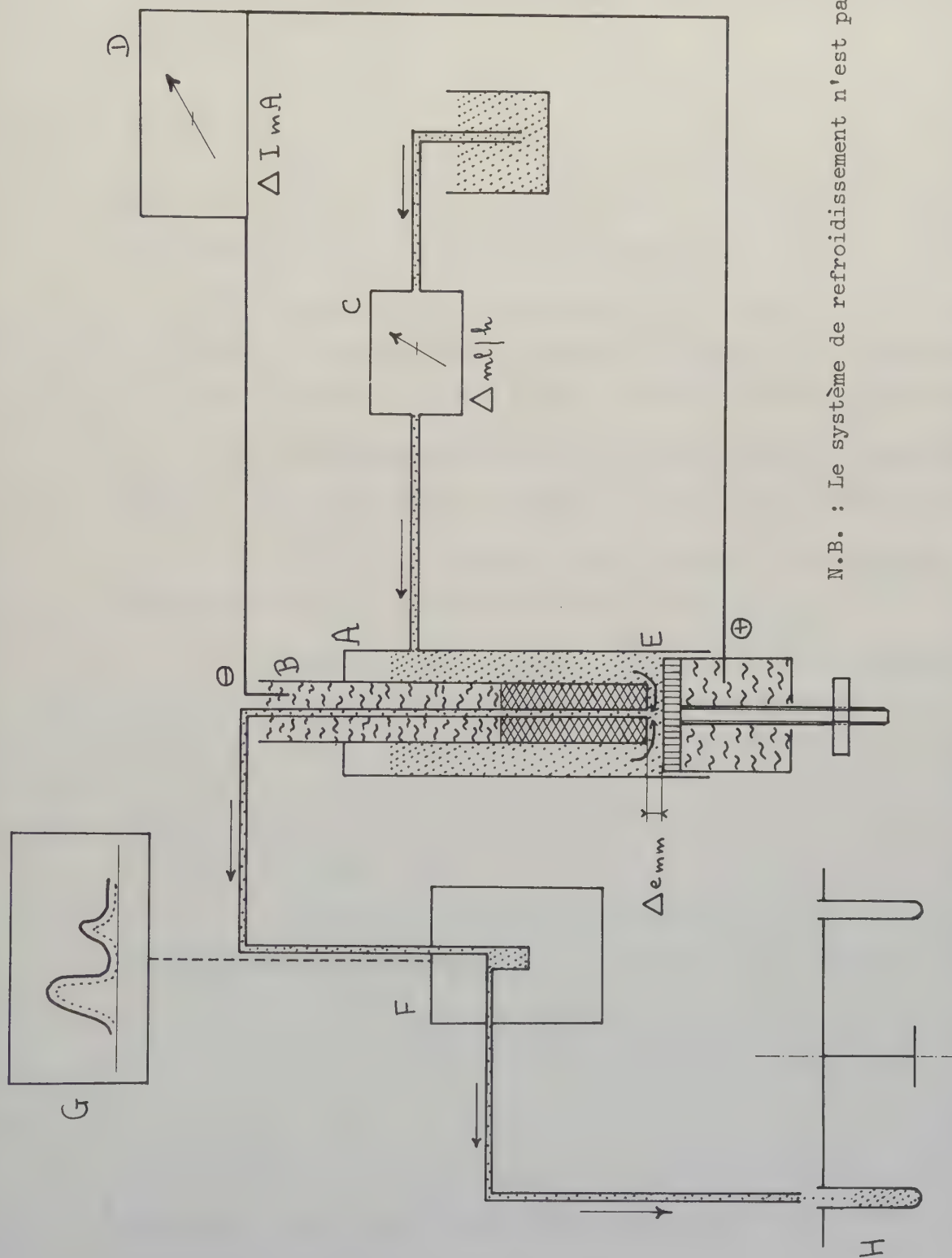
- une pompe péristaltique à débit variable pour régler le débit d'élution en cours d'électrophorèse.

L'électrophorèse préparative a été effectuée avec un appareil Canalco^{*}. Très fragile et de montage délicat, il possède cependant d'excellentes qualités :

- refroidissement externe et interne du gel,
- volume de la chambre d'élution ajustable de façon visible et ceci, même en cours d'électrophorèse,
- procédé d'élution radiale, très homogène,
- colonnes d'électrophorèses interchangeables de différents diamètres, adaptées à des échantillons plus ou moins importants.

En outre, l'équipe qui a imaginé cet appareil a mis au point des systèmes de gels et de tampons très élaborés.

* Brevet ORNSTEIN



N.B. : Le système de refroidissement n'est pas représenté

Figure 20 - Schéma de l'appareil d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide

A : cellule d'électrophorèse	E : fente d'élution	gel	Paramètres que l'on peut faire varier en cours d'électrophorèse.
B : colonne d'électrophorèse	F : absorptiomètre	tampon d'élution	$\Delta I \text{ mA}$: intensité affichée sur le générateur
C : pompe péristaltique	G : enregistreur	tampon d'électrophorèse	$\Delta \text{ ml/h}$: débit du tampon d'élution
D : générateur régulé en intensité	H : collecteur de fractions	disque d'élution	Δe : épaisseur de la fente d'élution

L'appareil, schématisé sur la figure 20, comprend une cellule A, une colonne cylindrique B et une chambre d'élution E, à volume variable, de diamètre fixe, dont on peut modifier l'épaisseur e . La base mobile de la chambre d'élution, appelée "disque d'élution", est constituée d'une matière vitreuse conductrice qui ne laisse pas passer les molécules protéiques. La chambre d'élution, observée latéralement, apparaît sous l'aspect d'une fente dite "fente d'élution".

La colonne de migration B employée est la plus petite des colonnes interchangeables que nous puissions monter sur l'appareil. La section du gel que l'on y coule est annulaire et d'une surface de 70 mm². Le refroidissement des surfaces externe et interne du gel assure la stabilité des protéines et la régularité de la migration électrophorétique.

Les électrodes sont reliées à un générateur D travaillant à intensité constante, quelles que soient les variations de résistance au cours de l'électrophorèse. On peut, à tout instant, afficher l'intensité désirée.

Le tampon d'élution est pulsé à l'aide d'une pompe péristaltique C dont on peut faire varier le débit en cours d'expérimentation.

L'éluat est recueilli sur un collecteur de fractions H, après passage dans la cuve d'un absorptiomètre enregistreur F et G.

Signalons que l'absorptiomètre utilisé* nous permet de mesurer en continu, et simultanément, à deux longueurs d'ondes choisies, la densité optique de l'éluat. La microcuve employée a un volume de 160 μ l et un parcours optique de 10 mm. Nous avons choisi comme longueurs d'onde 280 et 230 nm. Les résultats sont linéaires en densité optique et enregistrés sur un papier de 200 mm de largeur utile.

Le schéma de montage simplifié de la figure 20 indique les divers paramètres que l'on peut faire varier en cours d'électrophorèse.

Les expériences se déroulent entre + 15° C et + 18° C.

* Elugraphe - Seive constructeur, 78 - Rambouillet

3) Mode opératoire

a) Tampons et gels

Aux deux tampons du système tampon discontinu de la méthode analytique, il faut ajouter ici un tampon d'élution.

- tampon tris-glycine au niveau des électrodes

tris	3,0 g	pH = 8,3 à + 18° C
glycine	14,4 g	
eau distillée	q.s.p. 1000 ml	

- tampon tris-HCl, pour la confection des gels (solution stock A)

HCl N	48 ml	pH = 8,9 à + 18° C
tris	36,3 g	
temed	0,23ml	
eau distillée	q.s.p. 100 ml	

- tampon d'élution, préconisée par Canalco

solution A	1	volume
eau distillée	7	volumes

Le tris employé doit être particulièrement pur.

La solution stock CN du monomère et du co-monomère a la composition:

acrylamide	40 g
bisacrylamide	0,12g
eau distillée	q.s.p. 100 ml

La confection des gels s'opère, comme dans la méthode analytique, en présence d'une solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 0,14 % comme catalyseur (solution stock G).

Au niveau de la solution du monomère et du co-monomère, il existe des différences entre les méthodes analytique et préparative. Pour la méthode préparative, l'acrylamide et le bisacrylamide doivent être soigneusement purifiés et de plus, les initiateurs de la méthode préconisent un gel à 10 % en acrylamide et très faiblement concentré en bisacrylamide dont l'effet de "filtration moléculaire" sera le même que celui d'un gel analytique à 7 %. Ce

changement est nécessaire pour minimiser certains artefacts et améliorer la tenue du gel dans la colonne.

La formule du gel préparatif à 10 % est :

solution A	1 volume
solution CN	2 volumes
eau distillée	1 volume
solution G	4 volumes

Ce gel est caractérisé par les valeurs suivantes :

$$T = 10,30 \% \qquad C = 0,29 \%$$

b) Préparation et mise en place de la colonne

Dans la colonne, parfaitement propre, le gel est coulé jusqu'à la hauteur désirée ; une couche d'eau distillée de 2 mm d'épaisseur est déposée à la surface de la même façon que dans la méthode analytique, afin d'obtenir une surface de gel parfaitement plane.

La polymérisation demande 30 minutes à la température de + 15° C ou + 18° C.

Après la polymérisation, on rejette la couche d'eau distillée et la colonne est placée sur la cellule dont le compartiment anodique est déjà rempli de tampon. On verse avec soin du tampon dans le compartiment cathodique.

La stabilité de la température est assurée par une circulation d'eau dans les compartiments prévus à cet effet.

Le compartiment d'élution est rempli avec du tampon d'élution ; il est nécessaire d'opérer avec soin afin de ne pas emprisonner de bulles au niveau de la fente d'élution.

L'épaisseur de la fente d'élution est réglée à l'aide d'un bouton molleté qui déplace le disque d'élution. L'observation de la fente à l'aide d'une loupe 4x et d'une source de lumière vive facilite considérablement le réglage.

La pompe péristaltique est alors connectée à l'entrée du compartiment d'élution et le tube de sortie de l'éluat est relié à la micro-cuve de l'absorptiomètre avant de rejoindre le collecteur de fractions.

c) Préparation et mise en place des échantillons

Les extraits lyophilisés sont repris par un certain volume d'eau distillée ; l'augmentation de densité s'obtient en ajoutant 50 mg/ml de saccharose. Une goutte de solution aqueuse de bleu de bromophénol à 0,005 % est également ajoutée à l'échantillon ; ce colorant migre avec le front mobile qui se développe lors de l'électrophorèse et permet ainsi de suivre la migration électrophorétique.

Un certain volume d'échantillon est déposé, dans la colonne de migration, à l'interface gel/tampon, à l'aide d'une seringue de 1 ml munie d'une longue aiguille.

d) Electrophorèse

Après mise en place des électrodes, on affiche l'intensité désirée que l'on pourra modifier en cours d'électrophorèse.

Immédiatement, le tampon d'élution est pulsé avec un débit donné que l'on pourra faire varier en cours d'opération ; la fente d'élution pourra être réglée à tout moment.

Le profil d'élution s'inscrit sur l'enregistreur de l'absorptiomètre et l'éluat est recueilli dans le collecteur de fractions.

A la fin de l'élution, le gel annulaire est retiré de la colonne et coloré au noir amide ou au Coomassie pour détecter les fractions non encore éluées.

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous envisagerons la préparation des extraits protéiques, leur fractionnement sur colonne de gel de Sephadex puis l'étude, à titre d'exemple, d'une fraction particulière.

1) Les extraits protéiques

Les extraits protéiques étudiés sont des extraits de partie transparente de muscle adducteur de *C. angulata* et d'*O. edulis*, obtenus selon le protocole précédemment exposé, et ensuite lyophilisés.

2) Le fractionnement primaire

Le fractionnement primaire est obtenu avec des colonnes (diamètre : 2,5 cm, hauteur : 45 cm) remplies de Sephadex G-75 "fine" ou G-100 "fine" suivant un mode opératoire précédemment détaillé (101).

Le tampon d'élution est le tampon phosphate d'extraction ; l'alimentation de la colonne en tampon se fait à l'aide d'un vase de Mariotte, l'effluent est recueilli sur un collecteur de fractions, après analyse à 280 nm dans un absorptiomètre en continu dont la cuve en quartz a un trajet optique de 0,3 cm. L'enregistrement se fait en % de transmission.

De plus, nous traçons, en général, la courbe d'élution, en densité optique, en passant toutes les fractions recueillies, au spectrophotomètre à 259 et 280 nm.

La figure 21 représente les profils d'élution des deux extraits de *C. angulata* et *O. edulis*.

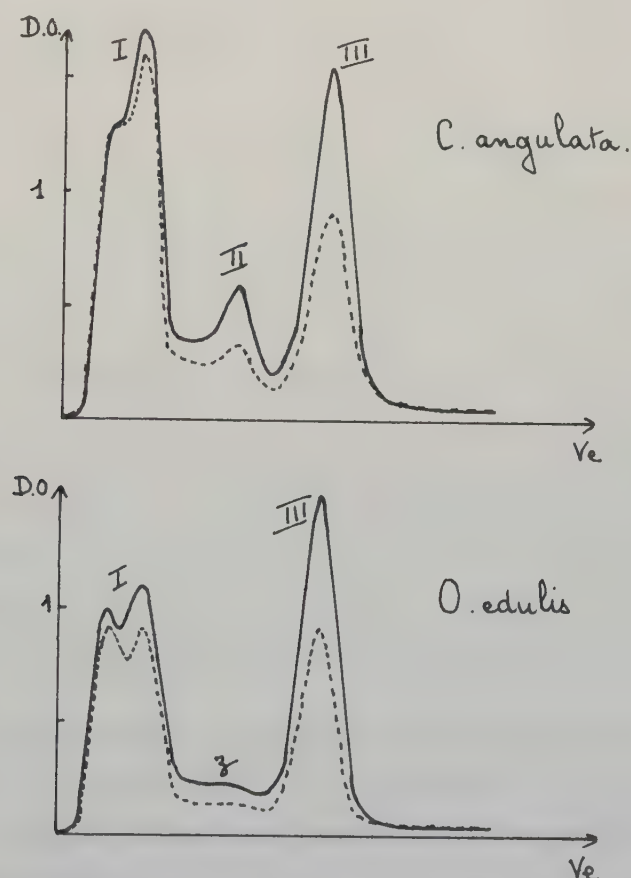


Figure 21 - Profils d'élution chromatographiques d'extraits de partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata* et *O. edulis*

— 280 nm

---- 260 nm

* Gilson Medical Electronics - Villiers le Bel

** Jobin et Yvon

L'extrait de *C. angulata* révèle trois pics que nous avons appelés I, II, III ; celui d'*O. edulis* n'en révèle que deux : I et III, on note l'absence du pic II. Ces résultats, déjà rapportés dans la thèse de P. MORE, sont confirmés par les nouvelles expériences que nous exposons.

Le pic III, présent dans les deux espèces d'huîtres représente environ 40 % des protéines solubles à la force ionique 0,05. Il apparaît sur tous les profils d'élution avec une bonne symétrie, il doit donc être homogène du point de vue poids moléculaire. L'estimation du poids moléculaire au sommet du pic, que nous avons maintes fois réalisée, confirme une valeur relativement faible voisine de 20 000 (101).

L'absorption de ce pic III est faible à 259 nm, le calcul classique (176) du rapport E_{280}/E_{260} nm, indique un taux d'acides nucléiques très faible. Le spectre ultra-violet de cette fraction III est un spectre "classique" de protéines avec un minimum à 250 nm, un maximum vers 280 nm et des épaullements probablement dus à la présence de tryptophane.

Ce pic III résiste bien à la chaleur en milieu acide (Cf photographie 14 de la planche hors-texte IV) (100).

Doté de caractéristiques physico-chimiques constantes, ce pic III apparaît comme la fraction la plus typique des protéines solubles du muscle adducteur. C'est celui qui a été étudié particulièrement par P. MORE (101) et que nous reprenons ici en électrophorèse préparative.

3) L'électrophorèse préparative

L'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide a déjà établi l'hétérogénéité de ce pic III, pourtant homogène à la chromatographie d'exclusion-diffusion. La figure 22 représente l'électrophorèse analytique de l'extrait de partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata* et du pic III de ce même extrait, pic séparé par chromatographie.

A la comparaison de ces deux électrophorégrammes, on constate que les bandes essentielles du pic III représentent les sous-fractions à migration rapide. Certaines sous-fractions assez intenses sont caractéristiques de l'espèce d'huître étudiée (P. MORE).

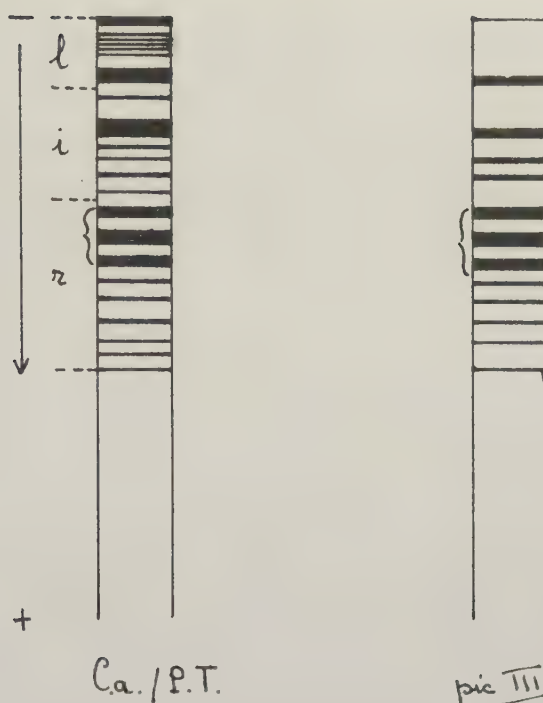


Figure 22 - Electrophorèse analytique d'extrait de partie transparente de *C. angulata* et du pic III correspondant

Nous avons appelé ces sous-fractions "bandes caractéristiques", elles sont en effet constantes, qualitativement bien définies et quantitativement importantes puisqu'elles représentent 25 % des protéines solubles du muscle total de *C. angulata*.

La méthode d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide doit permettre l'isolement de ces bandes au niveau desquelles il sera possible de rechercher les différences et les ressemblances existant entre des espèces voisines.

C. - APPLICATION A L'ISOLEMENT DES BANDES CARACTERISTIQUES

L'électrophorèse préparative appliquée aux extraits de partie transparente de muscle d'huître permet d'isoler trois sous-fractions caractéristiques pour l'huître portugaise (*C. angulata*) et une seule pour l'huître plate (*O. edulis*).

1) Fractionnement primaire

Les profils d'élution chromatographiques sont représentés sur les cinq figures suivantes. Les figures 23 et 24 concernent des profils en densité optique obtenus point par point au spectrophotomètre à 259 et 280 nm, pour des extraits de partie transparente de *C. angulata*. Les trois pics I, II et III sont bien marqués pour la colonne n° 41, par contre, pour la colonne n° 40, le profil est anormal mais le pic III y est relativement bien individualisé. Cette différence souligne l'importance du débit d'élution qui, pour la colonne n° 40 avait une valeur double de celle adoptée pour la colonne n° 41 ; le débit d'élution doit rester inférieur à 10 ml/heure pour que le fractionnement soit satisfaisant.

La comparaison des figures 25 et 26 représentant les profils en % de transmission, donnés directement par l'absorptiomètre Gilson, fait apparaître la différence existant entre les deux espèces d'huîtres : *C. angulata* (colonne n° 44) et *O. edulis* (colonne n° 42).

Sur la figure 27, nous avons superposé les profils d'élution des colonnes G-100 n° 41 et n° 44 pour illustrer la reproductivité de la méthode.

Nous avons indiqué sur le tableau III les différents paramètres de nos chromatographies.

La mesure du volume total du gel : V_t , de son volume interstitiel : V_o et du volume d'élution des fractions : V_e permet le calcul, pour chaque pic, du coefficient de partage K_{av} dont la formule donnée par LAURENT et KILLANDER (81) est :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Sur le tableau IV, figurent les résultats obtenus pour le pic III, les V_o étant les volumes d'exclusion des pics I que nous considérons comme des molécules exclues.

Pour chaque colonne, les fractions recueillies sur le collecteur et correspondant au sommet du pic III (aires hachurées sur les profils chromatographiques) sont mélangées et les protéines sont dosées dans le mélange. Le tableau V indique les fractions de pic III qui ont été conservées en vue de l'étude par électrophorèse préparative sur colonne de gel de polyacrylamide.

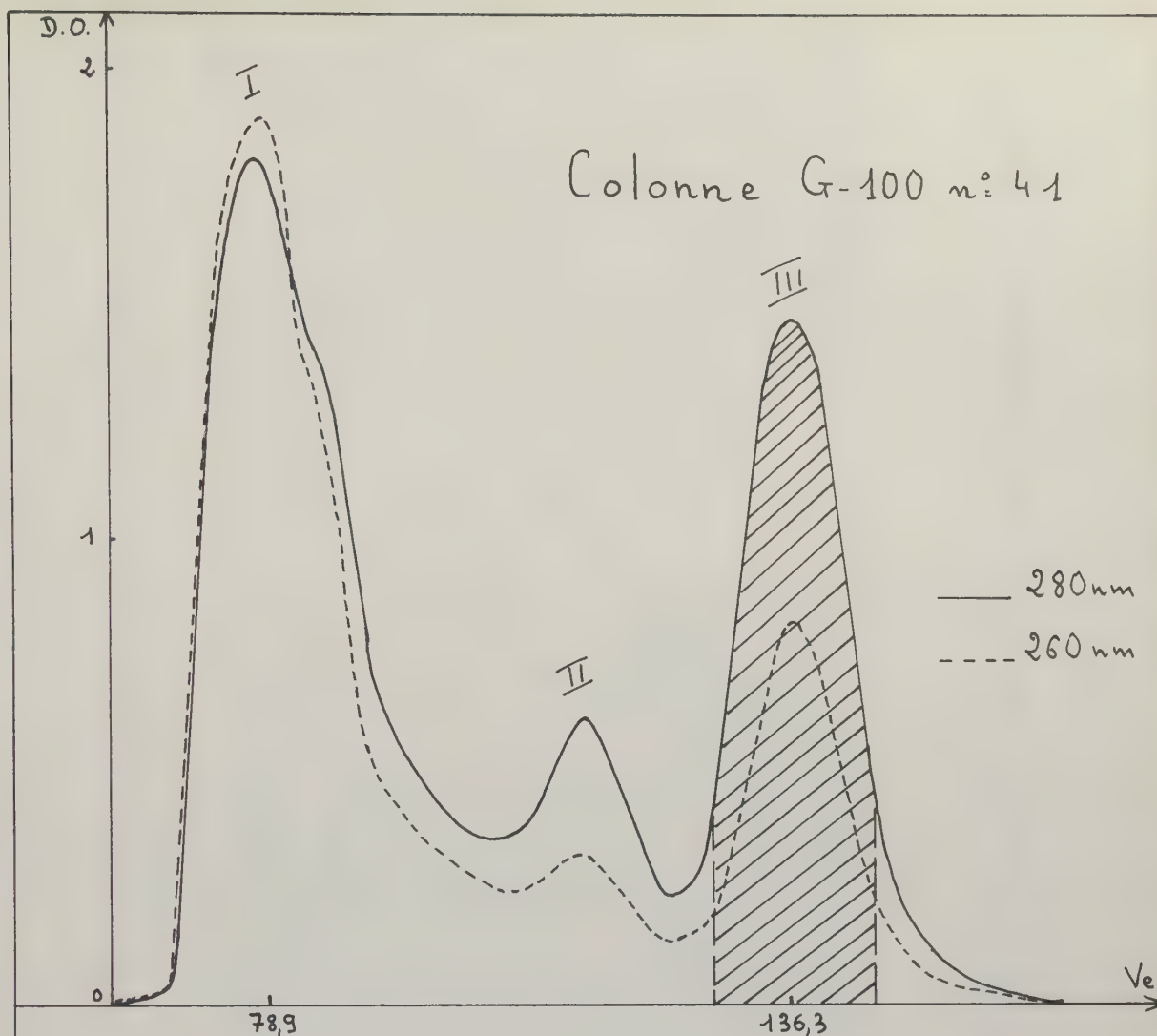


Figure 23 - Profil d'élution chromatographique d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata*.

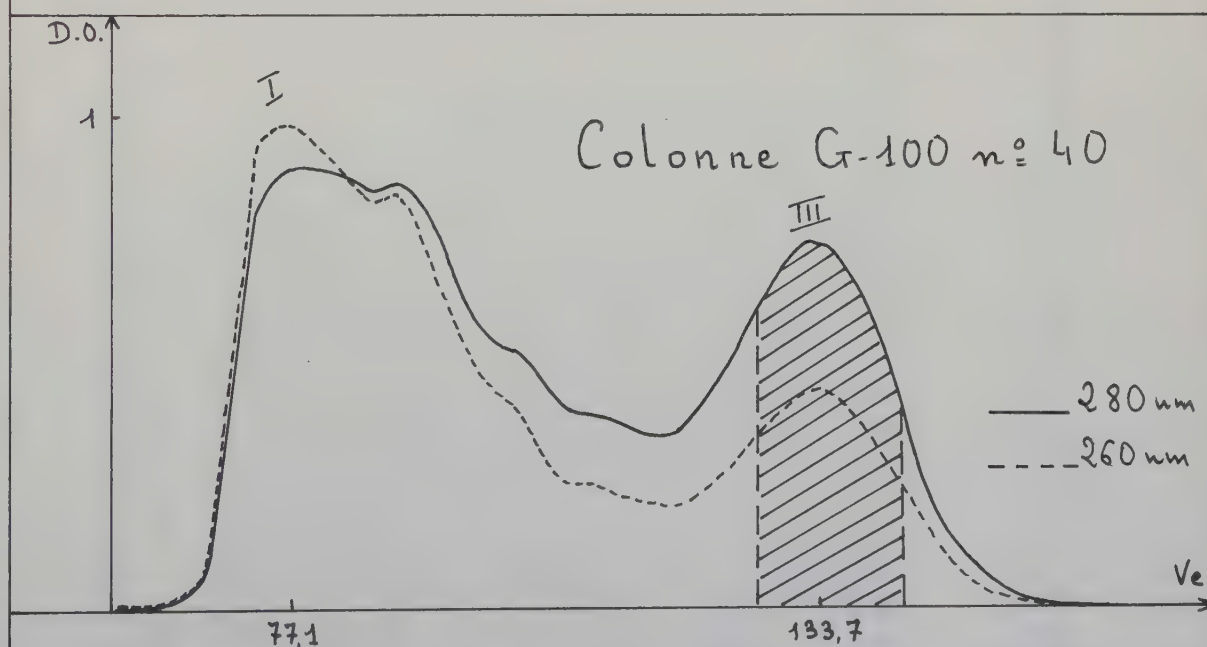


Figure 24 - Profil d'élution chromatographique d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata*.

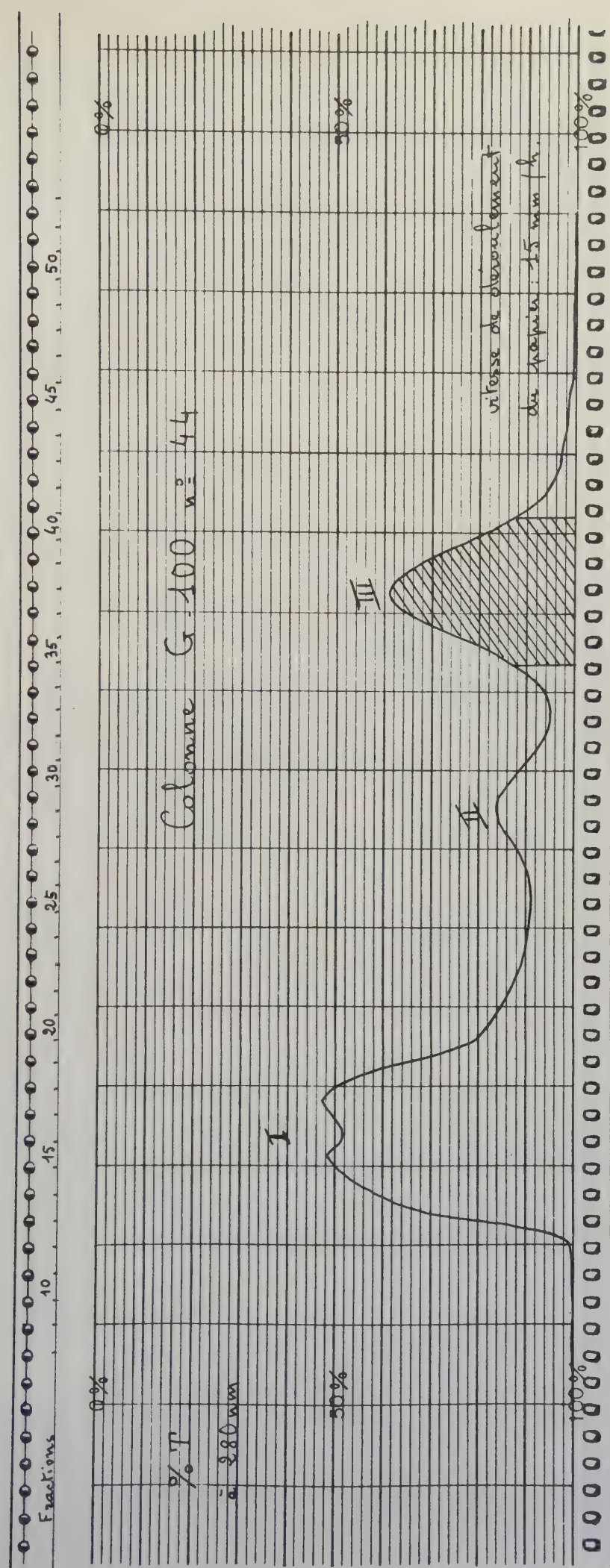


Figure 25 - Profil d'éluion chromatographique d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata*

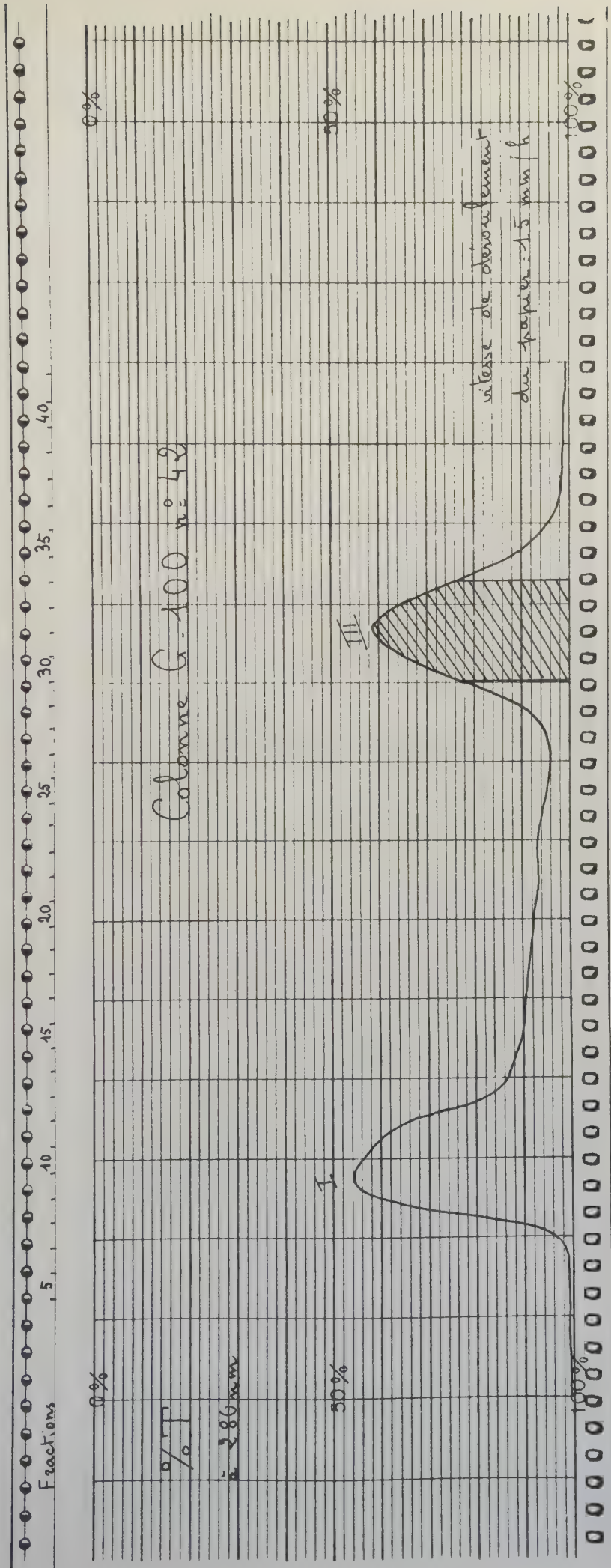


Figure 26 - Profil d'élution chromatographique d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur d'*O. edulis*

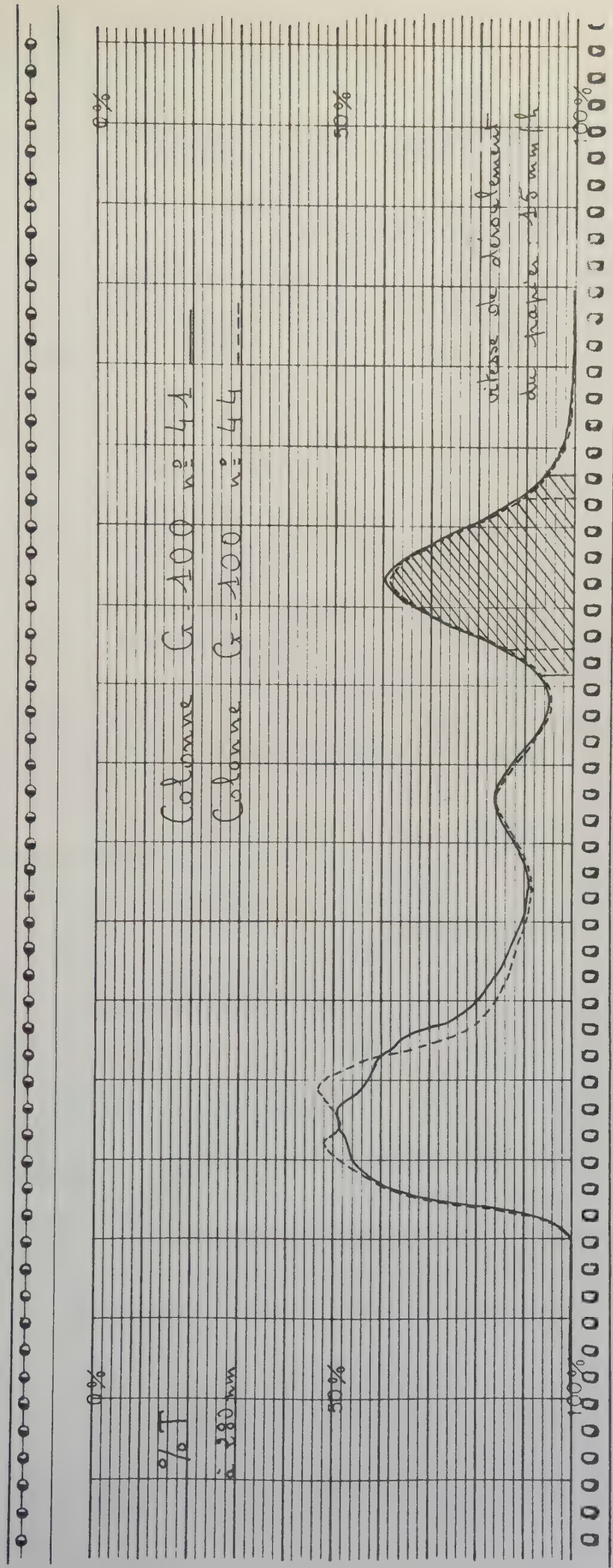


Figure 27 - Profils d'élution chromatographiques d'extraits de la partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata*

TABLeAU III

Paramètres chromatographiques

n° colonne		40	41	42	44
Sephadex		G-100 fine Lot n° 1395			
H : Hauteur du gel (cm)		40,7 $\pm$ 0,2			
Vt : Volume total du gel (ml)		199			
Vo : Volume interstitiel (ml)		77,1	78,9	74,6	75,2
D : Débit (ml/h)		15,4	8,17	8,21	7,94
P : Pression (cm eau)		7,0	4,5	4,5	5,5
t° : Température de l'expérience		+ 4° C			
Extrait déposé		C.a./P.T.	C.a./P.T.	O.e./P.T.	C.a./P.T.
	Volume de l'échantillon	1,8	1,8	2	1,8
	E : Poids de l'échantillon	32,4	34,12	35,0	34,12
F : Volume des fractions recueillies (ml)		2,6	2,6	2,5	2,5

TABLEAU IV

Calcul du coefficient de partage K_{av} du pic III

Colonne n°	V_t	V_o	V_e III	$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$
G-100 40	199	77,1	133,7	0,464
G-100 41		78,9	136,3	0,478
G-100 42		74,5	129,5	0,442
G-100 44		75,2	131,5	0,454

TABLEAU V

Fractions chromatographiques conservées pour l'étude du pic III

Extrait	Colonne n°	Fractions du pic III récupérées			Electrophorèses préparatives réalisées
		n° des tubes récupérés	volume ml	teneur en protéines mg/ml	
C.a./P.T.	40	50 à 56	18,2	0,75	n° 5
C.a./P.T.	41	30 à 37	20,8	0,95	n° 1 n° 2 n° 3
O.e./P.T.	42	30 à 33	10,0		n° 6
C.a./P.T.	44	35 à 40	15,0	1,15	n° 4

2) Electrophorèse préparative

Sur les mélanges protéiques de pics III, nous avons tenté plusieurs séparations électrophorétiques en faisant varier divers paramètres (longueur du gel, intensité, réglage de la fente d'élution, débit du tampon d'élution).

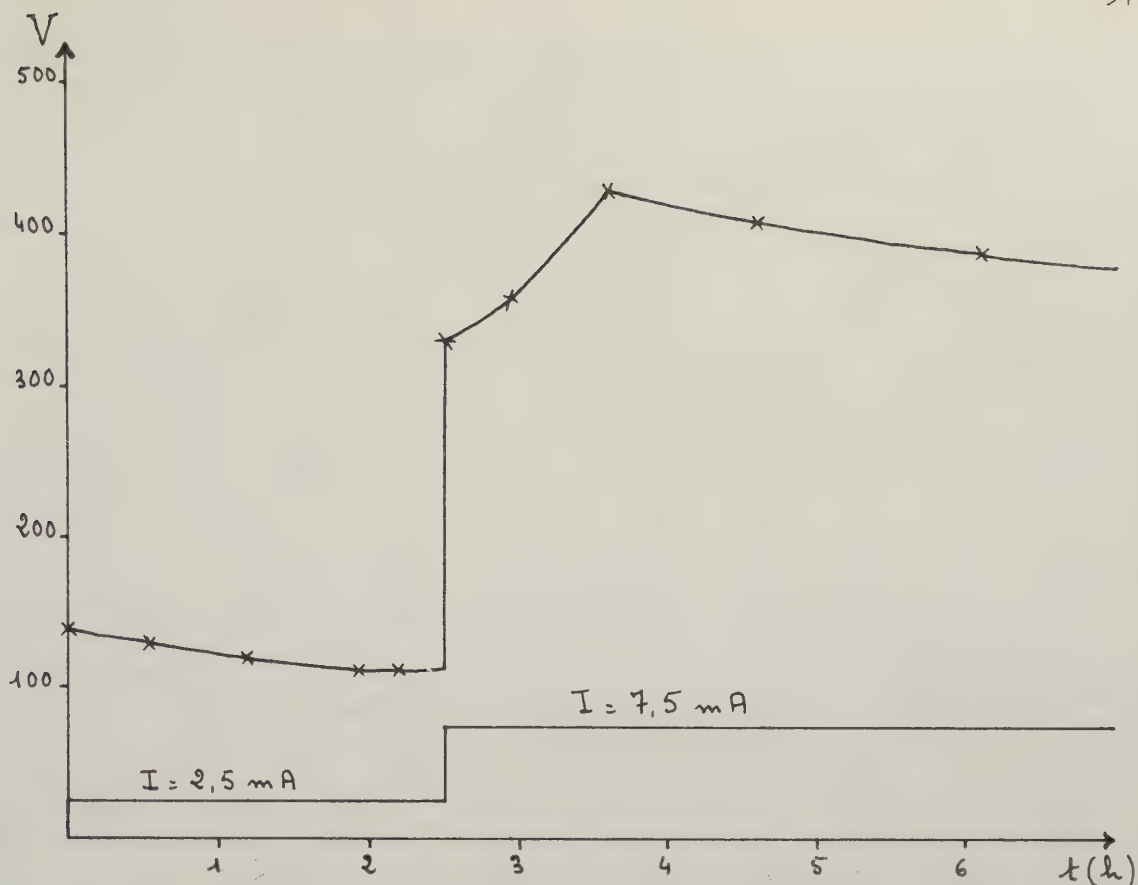
Les échantillons protéiques, de 2 à 3 mg, sont déposés sur la colonne de gel.

Au début de l'électrophorèse, nous affichons une intensité de 2,5 mA. Dès que l'appareil est sous tension, la pompe d'élution est immédiatement mise en marche et son débit réglé à une valeur voisine de 50 ml/h. Nous suivons l'électrophorèse libre de l'échantillon dans la solution dense de saccharose, grâce à la présence de bleu de bromophénol.

Après un temps variable selon l'échantillon étudié, le bleu de bromophénol pénètre dans le gel où il migre sous l'aspect d'une très fine couronne de coloration intense. Lorsque le colorant a parcouru deux millimètres dans le gel, nous augmentons la valeur de l'intensité à 5 mA ou 7,5 mA et lorsque le colorant a presque atteint l'extrémité inférieure du gel, les lignes de base de l'enregistreur sont réglées tant à 280 nm qu'à 230 nm. En effet, en plus de la longueur d'onde 280 nm (maximum d'absorption classique des protéines), nous avons choisi celle de 230 nm à laquelle l'absorption des protéines est encore plus importante, quoique moins spécifique.

Au début de l'expérience, l'absorption à 230 nm est importante car il existe dans le gel des substances qui absorbent fortement à cette longueur d'onde. Ces substances migrent et sont éluées dans les premiers temps de l'électrophorèse. L'absorption baisse alors peu à peu, devenant presque nulle, c'est à ce moment que les réglages de la ligne de base peuvent être effectués.

Sur les cadrans du générateur, on peut suivre les variations de la tension ; elle est d'abord de 140 volts environ, elle diminue ensuite légèrement puis, au moment où le colorant pénètre dans le gel, elle augmente en deux temps pour atteindre des valeurs de l'ordre de 400 volts, enfin elle diminue lorsque le colorant est élué. Le schéma ci-après indique ces variations en fonction du temps.



La sortie du bleu de bromophénol s'observe directement au niveau de la fente d'élution et s'inscrit sur l'enregistreur sous la forme d'un pic fin, généralement symétrique. L'observation constante de la fente d'élution à l'aide d'une lampe et d'une loupe permet un réglage convenable, réglage d'ailleurs très important. La sortie plus ou moins satisfaisante du colorant sert de test et nous amène à augmenter éventuellement l'épaisseur de la fente.

Les sous-fractions protéiques se manifestent sur l'enregistreur plus ou moins longtemps après le colorant. L'éluat est recueilli sur le collecteur à raison de 40 gouttes par tube, ce qui correspond à environ 1,10 ml.

Nous pouvons à tout moment faire varier le débit du tampon d'élution. Nous avons tenté, en particulier, de le diminuer afin de rendre plus visible l'une des sous-fractions.

Après chaque électrophorèse, le gel est récupéré et coloré au noir amide comme dans la méthode analytique pour révéler les fractions non encore éluées ; la coloration se fait en 12 heures et la décoloration demande alors 24 heures environ.

TABLEAU VI

Paramètres électrophorétiques

Electrophorèse préparative n°	2	3	4	5	6
Type d'échantillon	← ← ← ← ← C.a./P.T. 9-4-70 G-100 n°41 G-100 n°44 C.a./P.T. 23-2-70 G-100 n°40 O.e./P.T. 15-4-70				
Volume d'échantillon déposé	650 µl	675 µl	575 µl	575 µl	525 µl
Poids des protéines déposé	2,08 mg	2,625 mg	1,946 mg	2,875 mg	
Longueur du gel	4,5 cm	6 cm	4,4 cm	4,5 cm	4,5 cm
Intensité affichée après entrée du colorant dans le gel	7,5 mA	5 mA	7,5 mA	7,5 mA	7,5 mA
Débit du tampon d'élution	50-54 ml/h	52 ml/h	51 ml/h 27 ml/h	54,6 ml/h	54,6 ml/h 28,7 ml/h
Epaisseur de la fente d'élution	1,2 mm	1 mm	1,5 - 2 mm	1 mm puis 1,2 mm	1,2 mm
Temps mis par le B.B.P. à rentrer dans le gel (migration libre des protéines)	84'	110'	73'	134'	72'
Temps mis par le B.B.P. pour parcourir le gel	70'	140'	70'	71'	70'
Temps mis par les sous-fractions caractéristiques pour sortir du gel après le B.B.P.	S-F 1	103'	49'	48'	
	S-F 2	66'	62'	62'	64'
	S-F 3	86'	170'	82'	

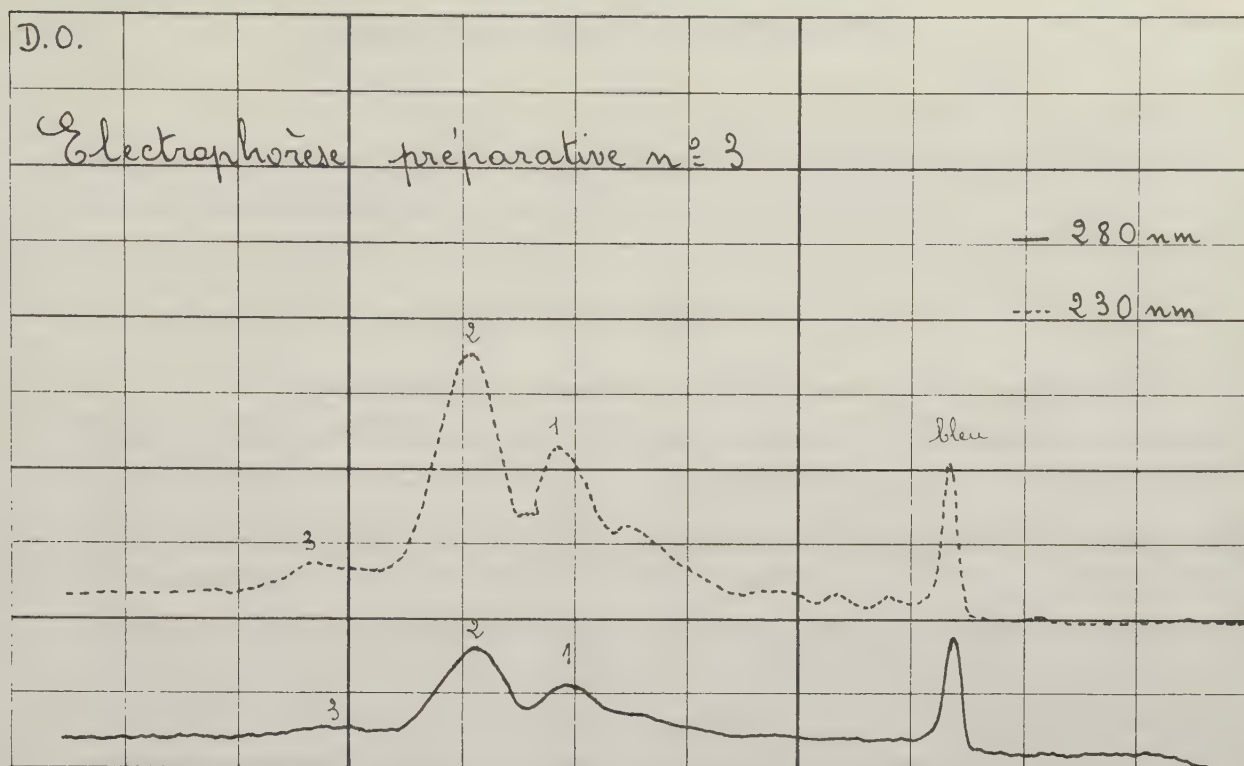


Figure 28 - Profil d'élution électrophorétique d'un pic III
(extrait de partie transparente de *C. angulata*)

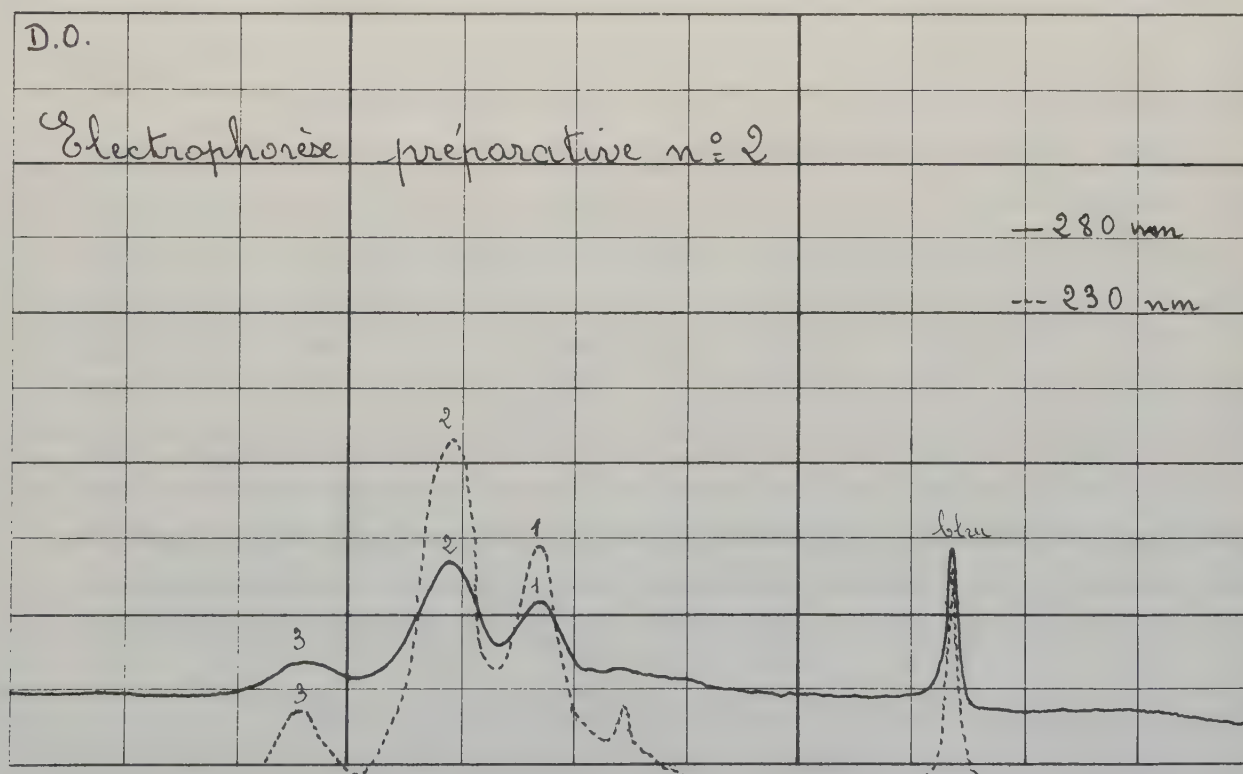


Figure 29 - Profil d'élution électrophorétique d'un pic III de partie
transparente de *C. angulata*

3) Etude des tracés électrophorétiques

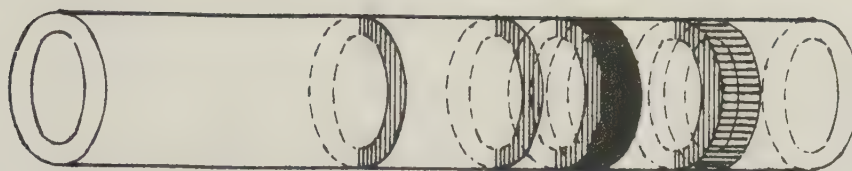
Nous avons inscrit au tableau VI les valeurs des paramètres envisagés lors des expériences d'électrophorèse préparative décrites ci-après, ainsi que les temps mesurés en cours d'analyse.

. Extrait de *C. angulata*

Electrophorèse préparative n° 3. Nous avons employé une longueur de gel de 6 cm et affiché une intensité de 5 mA dès la pénétration du colorant dans le gel. Sur la figure 28 apparaît à droite le pic de colorant, très fin et de droite à gauche, on observe d'abord, les bandes très rapides, faiblement détectées à 230 nm et encore moins à 280 nm puis les sous-fractions caractéristiques 1, 2 et 3 dont la séparation n'est pas satisfaisante, sur les deux profils, en particulier à 280 nm, la sous-fraction 3 est peu nette. De plus, le temps de l'expérience est très long ; la migration libre des protéines a demandé 110 minutes, ce qui peut s'expliquer par un effondrement du champ électrique à la suite de la trop forte concentration en sel de l'échantillon.

Electrophorèse préparative n° 2. Les résultats sont meilleurs avec un gel de 4,5 cm de longueur et une intensité plus élevée, amenée à 7,5 mA après pénétration du colorant dans le gel ; la fente d'élution est de l'ordre de 1 mm d'épaisseur. Le profil d'élution de la figure 29, représente la séparation de 2,08 mg de pic III d'un extrait de partie transparente de *C. angulata*. A droite, un pic très fin indique la sortie du colorant, puis de droite à gauche, on observe les bandes très rapides détectées à 230 nm qui ne sont pas toutes visibles sur le présent tracé. Par contre, les trois sous-fractions caractéristiques sont ici bien visibles à 280 nm et encore plus nettes à 230 nm ; la sous-fraction 2 est la plus importante, la sous-fraction 1, la plus rapide à l'électrophorèse, est de moyenne importance et la sous-fraction 3, la plus lente est la plus faible.

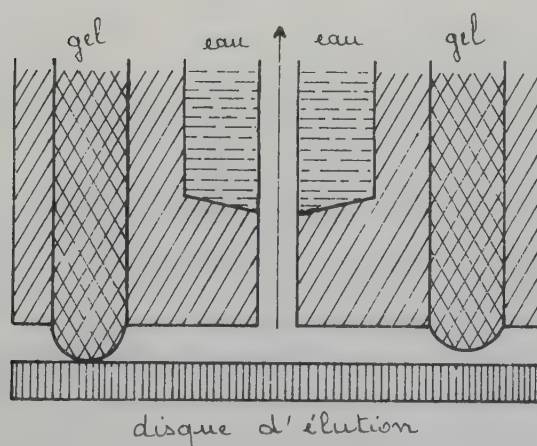
Après arrêt de l'électrophorèse, le gel est retiré de la colonne et coloré au noir amide ; quatre bandes demeurent encore dans le gel, leur disposition est la suivante :



Ces bandes doivent correspondre aux bandes peu intenses situées dans les zones intermédiaire et lente de l'électrophorégramme analytique du pic III (Cf figure 22).

Electrophorèse préparative n° 5. Le profil d'élution du pic III d'un autre extrait de partie transparente de *C. angulata* est représenté figure 30. Le tracé à 230 nm n'interfère pas avec celui à 280 nm et les interprétations sont plus faciles.

On remarque le dédoublement du pic de colorant dû au gonflement du gel qui a touché le disque d'élution sur une grande partie de sa surface empêchant l'élution de se dérouler normalement (Cf schéma ci-dessous).



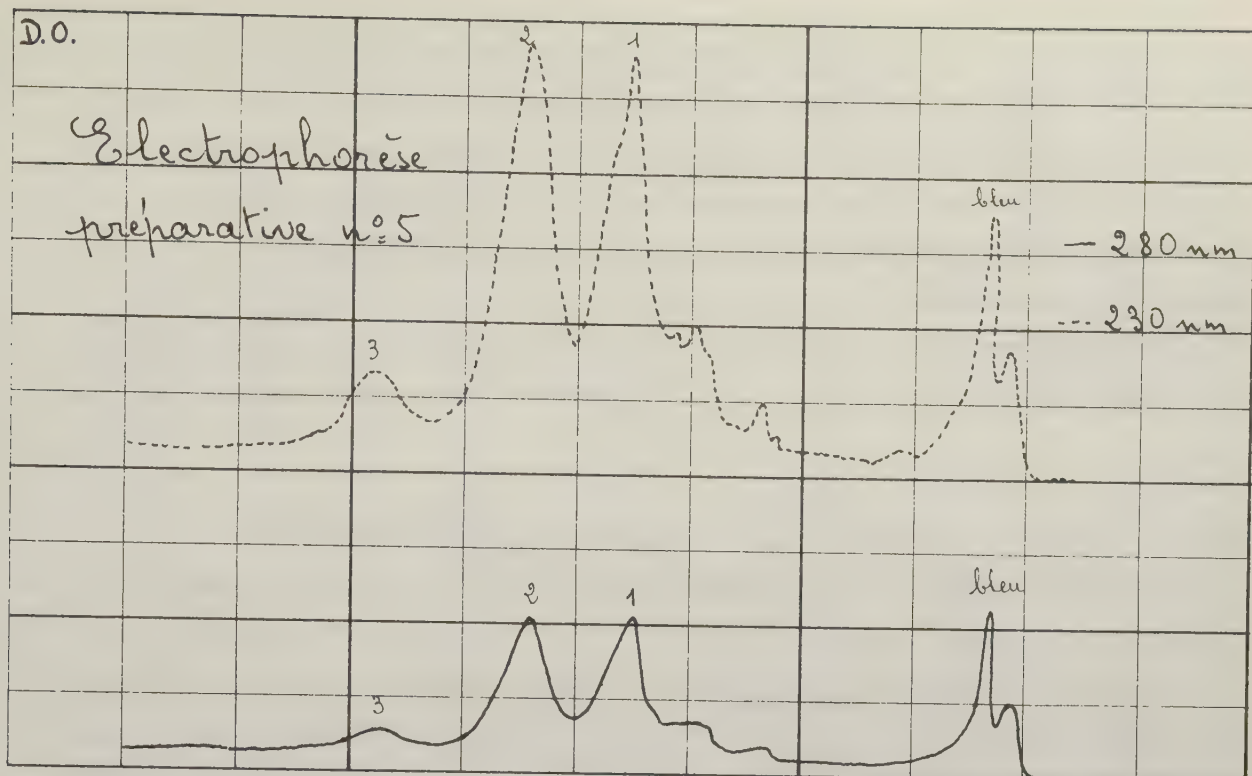


Figure 30 - Profil d'élution électrophorétique d'un pic III de partie transparente de *C. angulata*

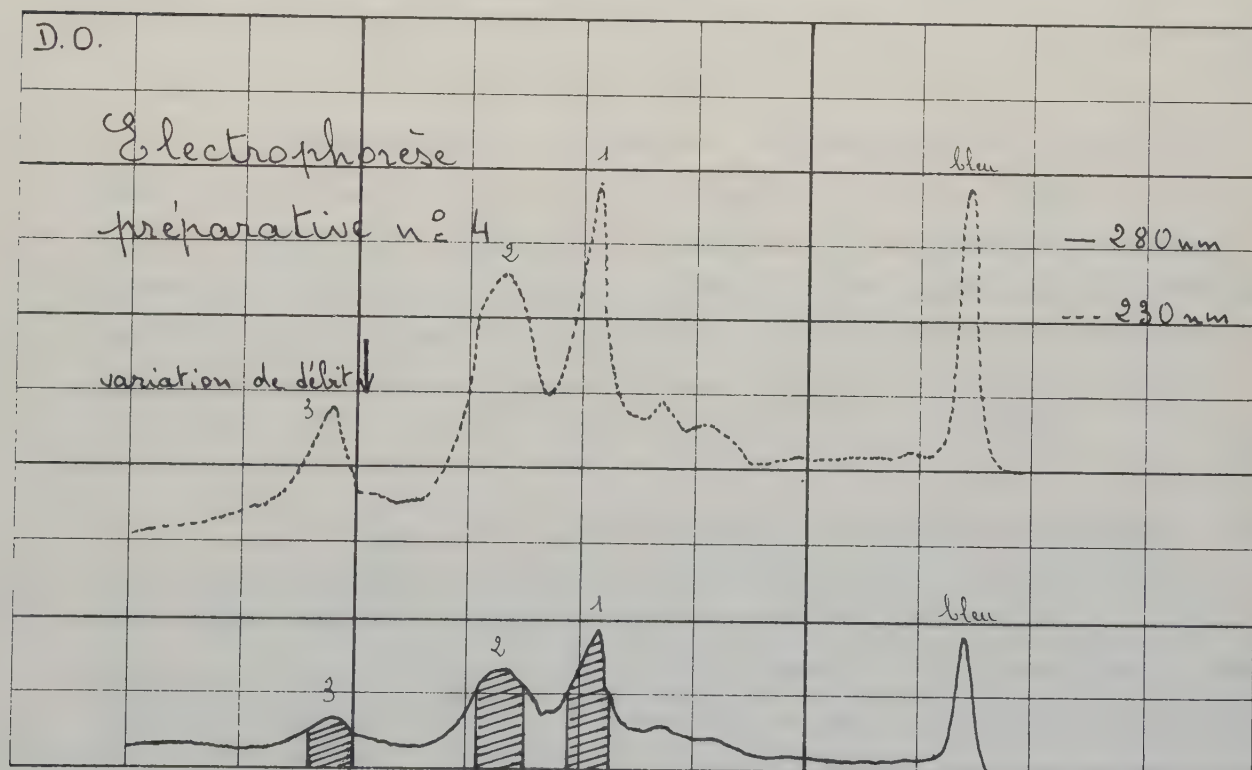


Figure 31 - Profil d'élution électrophorétique d'un pic III de partie transparente de *C. angulata*

C'est l'observation de la fente d'élution et son réglage qui permettent de remédier à un tel incident en abaissant le disque d'élution pour augmenter ainsi l'épaisseur de la fente. L'élution peut à nouveau s'effectuer convenablement ; le pic de colorant redevient net et le fractionnement électrophorétique peut alors se faire de façon satisfaisante. Les trois sous-fractions caractéristiques sont bien séparées. Le temps de migration libre des protéines est ici très augmenté, la concentration en sel de l'échantillon étant encore plus forte que dans l'expérience n° 3.

Electrophorèse préparative n° 4. La longueur du gel et l'intensité ayant été choisies en vue d'une bonne séparation des sous-fractions, nous avons essayé de faire varier le débit en cours d'expérience. Ainsi, la figure 31 présente une séparation effectuée avec un débit de 51 ml/h, ramené à 27 ml/h après enregistrement des sous-fractions 1 et 2. Nous constatons que cette diminution du débit de tampon d'élution permet de mieux mettre en évidence la sous-fraction 3, en augmentant sa concentration en protéines.

. Extrait d'*O. edulis*

Electrophorèse préparative n° 6. La figure 32 représente une séparation obtenue avec un pic III d'extrait de partie transparente d'*O. edulis*. Les paramètres adoptés, correspondant à ceux qui sont les plus favorables, sont indiqués dans le tableau VI. Nous obtenons la sous-fraction caractéristique que nous désirions isoler, bien marquée à 280 et 230 nm ; mais, cette sous-fraction apparaît assez homogène, surtout à 280 nm.

Ces expériences d'électrophorèse préparative ne permettent pas, dans les conditions expérimentales indiquées, d'isoler les sous-fractions très rapides détectées cependant à 230 nm sur les profils d'élution. Par contre, nous avons une séparation satisfaisante des sous-fractions caractéristiques qui nous intéressent. Il reste dans le gel, ce que l'on peut observer en le colorant, les sous-fractions les moins rapides que l'on ne peut éluer dans des temps convenables, en appliquant les paramètres électrophorétiques indiqués.

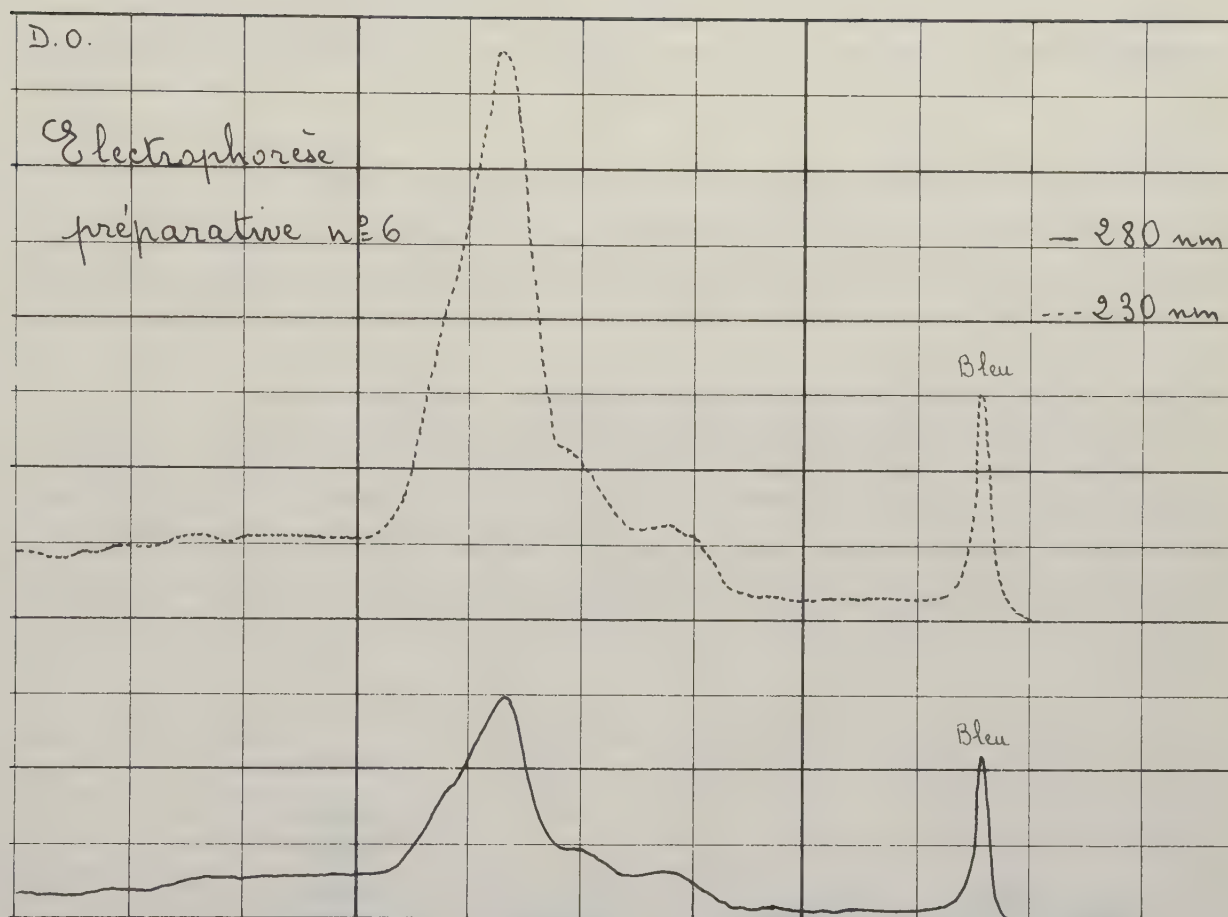


Figure 32 - Profil d'élution électrophorétique d'un pic III de
partie transparente d'*O. edulis*

4) Contrôle

Afin de vérifier le bon isolement préparatif des sous-fractions qui, en électrophorèse analytique, doivent chacune donner une seule bande, nous avons mélangé le contenu des tubes du collecteur, correspondant à chacune des sous-fractions étudiées. Après lyophilisation, dans un but de concentration, les mélanges sont analysés par électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide.

Les échantillons dont la densité a été augmentée par adjonction de saccharose, sont teintés avec une goutte de bleu de bromophénol et disposés à la surface du gel à l'aide d'une seringue munie d'un capillaire. Le système tampon employé est discontinu (voir p.14).

L'électrophorèse analytique est menée à 1 mA par colonne de gel jusqu'à ce que le colorant ait pénétré dans le gel ce qui demande environ 25 minutes, puis on passe à 2,5 mA pendant le temps nécessaire pour obtenir une migration de 3 ou 3,5 cm. La coloration se fait au noir amide ou au Coomassie ; la décoloration est opérée dans des bains d'acide acétique à 7 %.

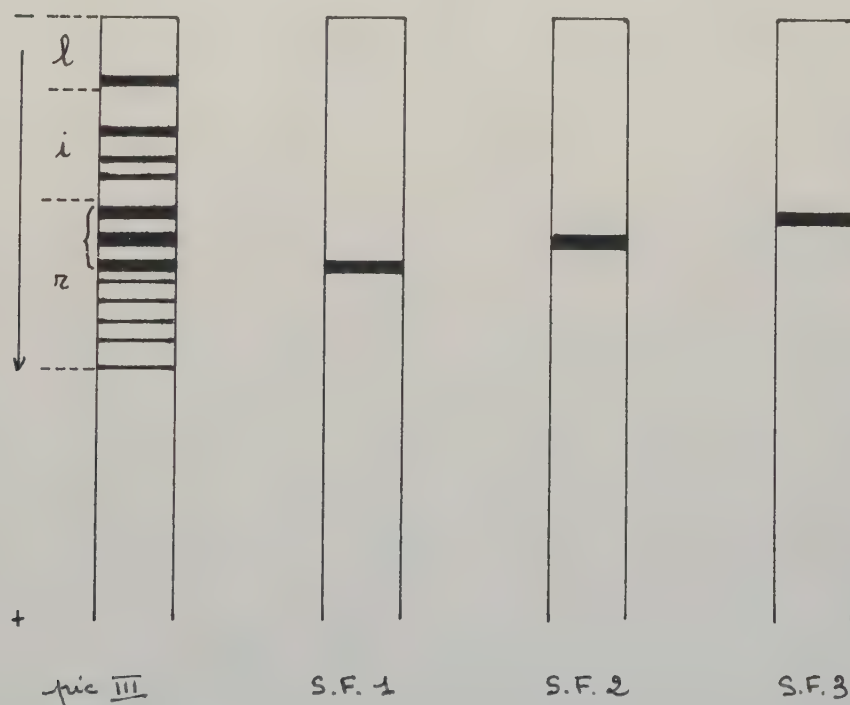


Figure 33 - Electrophorégrammes analytiques en gel de polyacrylamide d'un pic III de partie transparente de *C. angulata* et des sous-fractions 1, 2 et 3 isolées par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide

Au départ, le pic III comportait un certain nombre de bandes dont les trois caractéristiques que nous avons séparées. Les trois sous-fractions obtenues sont représentées chacune par une seule bande qui se place au niveau correspondant à celui qu'elle occupait dans le pic III. Cette technique de contrôle nous permet de considérer comme satisfaisante l'électrophorèse préparative envisagée pour séparer les sous-fractions caractéristiques.

Nous avons également vérifié par densitométrie que les sous-fractions isolées se plaçaient au même niveau que la bande correspondante du pic III. La figure 34 reproduit l'enregistrement d'un pic III et celui d'une bande isolée, dans ce cas, la sous-fraction 2, dont le pic est très fin et bien symétrique.

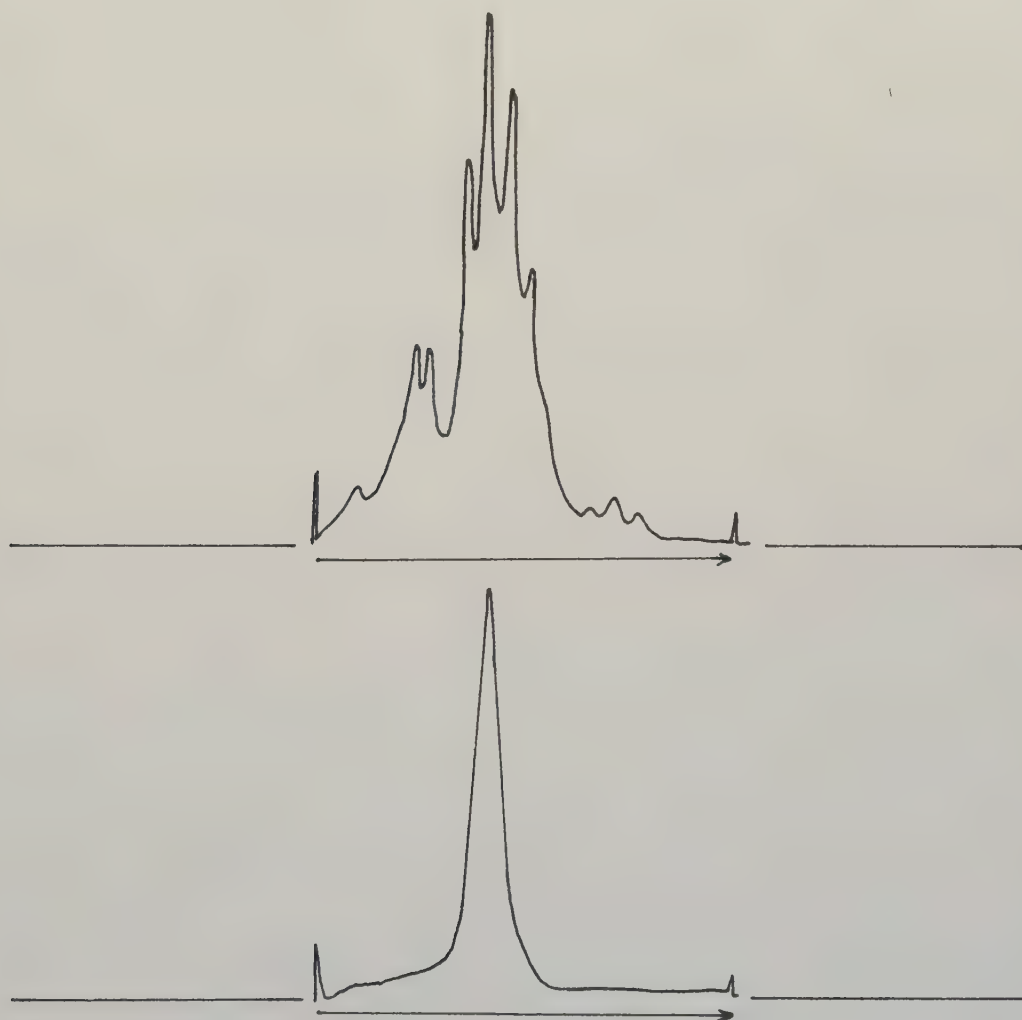


Figure 34 - Profils densitométriques des électrophorégrammes analytiques en gel de polyacrylamide d'un pic III de partie transparente de *C. angulata* et de la sous-fraction 2 isolée par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide.

Les sous-fractions caractéristiques obtenues par électrophorèse préparative peuvent être soumises à de nombreuses analyses ultérieures :

- tenue à l'ultracentrifugation en gradient de saccharose ou à l'électrofocalisation éventuellement en gel de polyacrylamide,
- étude sur DEAE - cellulose,
- étude des poids moléculaires,
- étude de la tenue à la chaleur.

Dans le présent travail, nous envisageons leur utilisation possible pour des techniques immunologiques et enzymologiques dans le but d'approfondir les caractères communs et différentiels des protéines solubles des muscles adducteurs des Lamellibranches.

TROISIEME PARTIE

METHODES IMMUNOLOGIQUES

METHODES IMMUNOLOGIQUES

Les méthodes immunologiques rendent de grands services au point de vue taxonomique. TRAN VAN KY et ses collaborateurs (165) l'affirment à la suite d'études immuno-électrophorétiques sur des mollusques. Dans leurs travaux de 1962, les antigènes sont préparés à partir de corps entiers de gastéropodes d'eau douce : *Australorbis glabratus*, *Planorbis corneus*, *Limnea palustris*, *L. stagnalis* et *L. limosa*. Les immun-sérums sont obtenus par injection hebdomadaire sous-cutanée, des antigènes additionnés d'adjuvant de Freund, pendant 16 semaines. Les auteurs soulignent que la méthode est fructueuse lorsqu'il s'agit de comparer des espèces voisines, mais perd de sa valeur lorsque les espèces s'éloignent dans la systématique ; en effet, si les fractions protéiques constituant l'originalité de l'espèce sont révélées, celles qui caractérisent une famille ou un groupe systématique plus vaste ne le sont pas.

NUMACHI (121) a fait une étude sérologique de cinq espèces d'huîtres en employant des techniques de précipitation et d'immuno-diffusion. Les antigènes sont des sérums d'huîtres adultes : *Crassostrea gigas*, *C. rivularis*, *C. angulata*, *C. virginica* et *Ostrea edulis* ou des extraits de larves de *C. gigas*, *C. rivularis* et *C. angulata*. L'immunisation est pratiquée, dans les deux cas, sur des lapins. Par le test de l'anneau, il a constaté que les diverses espèces ont des antigènes communs ou similaires, que de grandes différences existent entre les deux genres mais qu'il y a de grandes ressemblances

entre les espèces de *Crassostrea*. Par les tests d'absorption, il a observé que quatre espèces ont des antigènes spécifiques alors que *C. rivularis* n'en a pas. NUMACHI a même étudié quatre races locales de *C. gigas*, qui ont en commun un antigène spécifique, absent dans les autres espèces mais elles présentent des différences antigéniques en accord avec leur degré d'isolement géographique. Les immunisations obtenues avec les extraits de larves par injection intraveineuse, puis sous-cutanée avec un adjuvant, donnent de bons résultats pour déterminer les composants antigéniques. Les tests d'absorption montrent que les larves de *C. rivularis*, *C. gigas* et *C. angulata* ont trois antigènes communs, et que *C. rivularis* a trois antigènes spécifiques qui sont absents dans les deux autres espèces. De même *C. gigas* et *C. angulata* ont un ou deux antigènes spécifiques communs qui n'existent pas chez *C. rivularis*.

DENUCE et CUSHING, en 1963, ont comparé les hémocyanines de divers crustacés et mollusques dont un ormeau, l'*Haliotis rufescens*, par des méthodes immunologiques. Les immun-sérums, réalisés chez des lapins, avec les sérums défibrinés des espèces étudiées, sont analysés par diffusion et immuno-électrophorèse en gel d'agar. Les mollusques donnent des réactions négatives avec des sérums anti-crustacés. (42)

HUNEEUS-COX (65), en 1964, a étudié les protéines de l'axoplasme du céphalopode *Dosidicus gigas* par disc-électrophorèse et immuno-diffusion. Des lapins sont immunisés avec les protéines axoplasmiques ou le sang de ce mollusque ; les recherches de la spécificité des protéines et celles d'antigènes communs sont effectuées en double diffusion et par la combinaison des deux techniques.

ROSE, OSTEUR, ROSE et TRAN VAN KY (140) ont continué, en 1966, leurs travaux sur les mollusques, par l'étude d'extraits totaux de gastéropodes, en particulier de bulins. Ils emploient l'immuno-électrophorèse en agarose et la disc-électrophorèse ; ils pensent que seule cette dernière technique permet la différenciation d'espèces très voisines et de souches d'une même espèce.

DAVIS (37), en 1968, a fait l'étude immunologique des extraits de muscle du pied de deux gastéropodes : *Semisulcospira libertina* et *S. trachea*, par disc-électrophorèse, en double diffusion suivant une micro-méthode et par immuno-électrophorèse en agar. Les immun-sérums sont obtenus chez des lapins albinos par injection des extraits par voie intra-veineuse ou sous-

scapulaire. Il conclut à l'identité des deux espèces étudiées ; les différences génétiques sont trop peu importantes pour justifier même d'une sous-espèce.

Avec des techniques identiques, ce même auteur a envisagé une étude systématique de *Oncomelania hupensis chiui* (38).

D'autres travaux très importants ont été réalisés par DAVIS (39) sur les mollusques, hôtes intermédiaires de parasites de l'homme ou d'animaux.

Ces travaux sur les Mollusques montrent l'intérêt des études immunologiques pour l'identification des espèces. N'ayant pas rencontré de publication sur les protéines de muscles adducteurs de Lamellibranches, nous avons abordé cette étude en partant d'extraits protéiques de muscle d'Ostreidae.

Nous avons dû, au préalable, étudier des protocoles d'immunisation et des méthodes générales d'essai, afin de choisir les techniques les mieux adaptées à nos objectifs.

A - PROTOCOLES D'IMMUNISATION

Pour nos études immunologiques d'extraits d'huîtres, nous avons choisi le lapin, animal habituellement utilisé. Des lapins blancs mâles, de race pure néo-zélandaise*, pesant au départ 2,5 à 3 kg, ont été placés en cage individuelle dont le fond est constitué par des plaques de contreplaqué perforé ou mieux d'acier inoxydable perforé. Nous avons dû écarter le grillage métallique pour les immunisations par piqûres intradermiques dans les coussinets plantaires, afin d'éviter des irritations locales et des infections. La nourriture est de 150 grammes par jour de granulés C 17 Extralabo.

Parmi les très nombreuses méthodes d'immunisation, après quelques expériences préliminaires, nous avons été amenés à retenir celles utilisant l'adjuvant de Freund. Les injections peuvent se faire par voie intradermique, sous-cutanée, intra-musculaire, intra-péritonéale ou intra-veineuse, à des intervalles et pendant des temps plus ou moins longs.

* Provenance : Centre d'Elevage d'Animaux d'Ardenay

Parfois une seule piqûre est préconisée (180) avec saignée 8 semaines après, parfois les piqûres se font tous les 2 jours pendant 3 semaines avec saignée 8 jours après. Dans d'autres protocoles, des séries d'injections sont faites de façon plus espacée, soit une piqûre par semaine pendant 4 ou 5 semaines (71), (181), avec saignée une semaine après la dernière injection, soit toutes les trois semaines pendant plusieurs mois (182) ou toutes les quatre semaines, avec des périodes où les piqûres se font tous les deux jours et ceci pendant 8 mois (180).

Certains auteurs font des immunisations en pratiquant des piqûres tous les jours pendant 5 à 9 jours, suivies de périodes d'arrêt variables : 21 jours ou 2 mois ; ils complètent l'immunisation par une nouvelle série de piqûres (37).

La faible concentration en protéines des extraits d'huîtres étudiés, de l'ordre de 5 mg/ml et la difficulté d'en obtenir de grandes quantités, nous ont amenés à choisir des protocoles ne nécessitant ni des injections trop fréquentes, ni des doses trop massives d'antigènes.

Les extraits protéiques d'huître lyophilisés sont repris au demi en général, par de l'eau distillée. Le liquide, filtré sur supports-filtre Millipore Swinnex-13 équipés de filtres GS 0,22 μ , préalablement stérilisés, est recueilli dans des tubes stériles et mélangé avec un égal volume d'adjuvant complet de Freund*, de formule :

Bacilles tuberculeux, tués et séchés	10	mg
Huile de paraffine	1,43	ml
Monooléate de mannitol	8,57	ml

Le mélange est émulsionné à l'aide d'un "whirlmixer" puis injecté.

Les injections intradermiques, pratiquées dans les coussinets plantaires, assurent une diffusion lente de l'antigène dans l'organisme. Pour limiter les réactions qui gêneraient l'expérimentation, nous avons immobilisé l'animal à l'aide d'un dispositif spécial (182). Certaines injections, notamment celles de rappel, ont été faites dans la région sous-scapulaire.

* B.D. Mérieux

Les injections dans les cinq coussinets de deux ou de quatre pattes se font avec des seringues stériles munies d'aiguilles stériles Gillette 16 mm 5/10. Pour les injections dans la région sous-scapulaire, on utilise des aiguilles de 25 mm 9/10.

Deux protocoles d'immunisation ont été finalement adoptés :

- le premier, adapté de DAVIS (37), comporte deux séries d'injections dans les coussinets plantaires, la première de 20 mg de protéines dans les coussinets de deux pattes, la seconde de 5 mg dans les deux autres pattes, une semaine après ; le sang est prélevé 26 jours après,

- le second dérivant de celui de VAISMAN (167), consiste à injecter 5 mg de protéines dans les coussinets plantaires de deux ou de quatre pattes, puis 10 mg dans la région sous-scapulaire le 28ème jour ; le sang est prélevé une semaine après.

Dans les deux protocoles, des rappels sont effectués avec une quantité d'extrait égale à celle de la deuxième injection, en sous-scapulaire.

Le sang est prélevé à l'oreille du lapin soit à la veine marginale, soit à la veine centrale avec des aiguilles 25 mm 9/10, le lapin étant placé dans une boîte à contention*. Le sang est recueilli dans des tubes secs inclinés à 45° et placé à l'étuve à + 37° C, pendant une heure. Après maintien au réfrigérateur pendant 24 heures, le sérum est séparé par centrifugation à 2 000 g pendant 10 minutes (180) (182).

Les immun-sérums obtenus sont utilisés à l'état frais, ou après conservation au congélateur à - 25° C, mais, le plus souvent, ils sont lyophilisés, ce qui, avons-nous constaté, n'altère pas leurs propriétés.

B - METHODES GENERALES D'ETUDE

Nous avons eu recours pour nos essais à deux types de méthodes, la double diffusion en plaque et l'immuno-électrophorèse.

* Etablissements Carrieri - 174, boulevard Saint Germain - PARIS

1) Méthode de double diffusion en plaque suivant la technique
d'Ouchterlony (125)

Des plaques de verre 5 x 5 cm reçoivent d'abord une solution de gel à 0,1 % dans un égal volume de tampon et d'eau ; cette solution est, soit étalée au pinceau, soit déposée à la pipette sur les plaques préalablement dégraissées, et, après passage à l'étuve à + 70° C, ceci constitue une sous-couche permettant la stabilisation de la couche de gel, qui est coulée par la suite, et dans laquelle se fera la double diffusion.

Les gels employés sont l'agar* et l'agarose** A-37 et A-45 en solution à 1 % dans un mélange de tampon et d'eau distillée ; du merthiolate à 1 pour 10 000 est ajouté pour la conservation. Des essais ont été faits avec divers tampons.

On dépose avec une pipette, 8 ml de gel sur la plaque, pour obtenir une couche de 2 mm d'épaisseur. Des puits de 3,5 ou 4 mm de diamètre et distants les uns des autres de 4 ou 4,5 mm sont pratiqués à l'emporte-pièce, suivant divers motifs.

Des quantités de l'ordre de 25 µl d'extraits ou d'immun-sérums sont déposées dans les puits avec une seringue Microtrol.

La diffusion s'opère à + 20° C pendant 24 heures. Après fixation dans un bain de citrate de sodium à 5 % pendant une heure, les plaques sont lavées à plusieurs reprises dans des solutions tamponnées de chlorure de sodium à 9 % pendant 48 heures, ceci est très important pour obtenir la disparition de toutes les protéines qui n'ont pas précipité. Les plaques sont ensuite recouvertes de papier filtre et séchées à l'air libre pendant plusieurs jours, ou, opération plus rapide, à l'étuve à ventilation, à une température voisine de + 30° C.

La coloration au noir amide est de 5 minutes et la décoloration dans des bains successifs d'acide acétique à 2 % est suivie d'un rinçage à l'eau distillée.

* Special Agar Noble - Difco Laboratories

** Agarose A-37 et A-45 - Industrie Biologique Française

2) Méthode d'immuno-électrophorèse selon Grabar (57)

Nous utilisons des plaques de verre de 5 x 10 cm, qui sont également recouvertes d'une sous-couche, puis placées dans des boîtes de Pétri dont le fond a été nivelé avec du gel. On calcule la quantité de gel à verser dans ces boîtes afin d'obtenir une épaisseur de 3 mm sur les plaques. Après refroidissement, le gel est découpé au scalpel autour des plaques. Ce mode opératoire assure une épaisseur régulière de la couche de gel ce qui permettra une meilleure électrophorèse.

Des puits de 4 mm de diamètre et distants de 14 mm sont pratiqués dans le gel à l'aide d'un dispositif particulier ; entre ces puits une empreinte de gouttière de 2 mm de large est tracée.

Les plaques recouvertes de gel sont placées dans une cuve d'électrophorèse de Kohn, des ponts de papier Whatman n° 1 assurent la jonction entre le gel et le tampon.

L'électrophorèse est conduite pendant 5 heures sous 220 volts, soit 22 volts/cm ; l'intensité ne dépasse jamais 0,3 mA/cm.

A la fin de la migration électrophorétique, on retire le gel de la gouttière et on introduit l'immun-sérum frais ou concentré par lyophilisation, à l'aide d'une pipette Pasteur.

L'épaisseur du gel étant ici plus grande qu'en double diffusion, les temps opératoires sont allongés : diffusion de 3 jours, lavage de 4 jours et coloration d'une heure. La fixation et la décoloration des plaques se font comme pour une double diffusion.

C - MISE AU POINT DES TECHNIQUES UTILISEES

Aussi bien pour les méthodes de double diffusion que pour celles d'immuno-électrophorèse, nous avons essayé divers gels dans des tampons de compositions différentes. En outre, nous avons contrôlé la valeur des protocoles d'immunisation et précisé les quantités d'extraits et de sérums à utiliser. Enfin, nous avons vérifié la qualité des immun-sérums lyophilisés.

1) Choix du gel

L'agar a l'inconvénient de former des sous-couches avec des stries qui gênent l'observation des arcs de précipitation. De plus, en immuno-électrophorèse, la migration est nettement insuffisante et des déformations se produisent dans le gel.

Nous avons donc préféré l'agarose dont les sous-couches sont très nettes après séchage à l'étuve ; l'agarose A-45 est plus intéressant que l'agarose A-37 qui subit quelques déformations à l'immuno-électrophorèse.

2) Choix du tampon

Nous rapportons ci-après la formule des trois tampons essayés.

- tampon phosphate 0,15 M, de pH 7,1, préparé en mélangeant 67 ml de solution I de formule :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	26,70 g
eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

et 33 ml de solution II de formule :

KH_2PO_4	20,41 g
eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

- tampon véronal sodé de pH 8,2, obtenu par le mélange d'une partie d'eau distillée avec deux parties de tampon dont la solution mère a la formule :

véronal sodé	13,38 g
acétate de sodium, $3\text{H}_2\text{O}$	8,83 g
dans eau distillée	1 litre

amené à pH 8,2 avec HCl 0,1 N

- tampon tris-glycine de pH 8,5, dont la formule est :

tris	3 g
glycine	14,4 g
eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

Le tampon phosphate n'a donné de résultats satisfaisants dans aucune méthode. Par contre, le tampon véronal sodé donne des arcs de précipitation nets en double diffusion, mais les résultats sont moins bons en immuno-électrophorèse. Les essais avec le tampon tris-glycine révèlent un nombre d'arcs encore plus important qu'avec le tampon véronal sodé, de plus, c'est celui qui permet la meilleure résolution, en immuno-électrophorèse, pour la séparation des extraits de muscles d'Ostreidae ; nous l'avons donc retenu pour les deux méthodes.

3) Contrôle des immun-sérums

La valeur des protocoles d'immunisation employés peut être appréciée en étudiant la qualité des immun-sérums. Cette qualité est déterminée par le nombre d'arcs précipités en double diffusion.

Les résultats, que nous présentons, correspondent à l'immunisation pratiquée avec un extrait de partie transparente de muscle adducteur d'huître portugaise, *C. angulata*.

Premier protocole d'immunisation

Nous avons disposé dans le puits central un immun-sérum anti-huître portugaise prélevé 7 jours après la première injection de 20 mg de protéines et dans trois puits latéraux, l'extrait correspondant d'huître portugaise. Nous avons obtenu un arc de précipitation (figure 35).

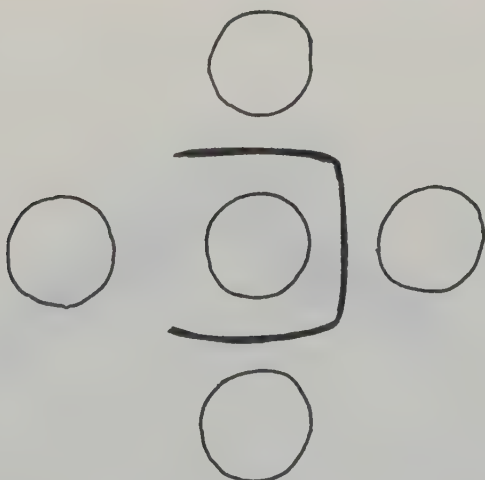


Figure 35 - Immun-sérum prélevé 7 jours après la première injection (20 mg)

Vingt six jours après la deuxième injection au lapin de 5 mg d'extrait protéique, les résultats obtenus avec l'immun-sérum étudié dans les mêmes conditions ne sont pas encore satisfaisants. Par contre, l'immun-sérum prélevé une semaine après la troisième injection de 5 mg, montre en double diffusion deux arcs nets et un troisième arc flou. (figure 36)

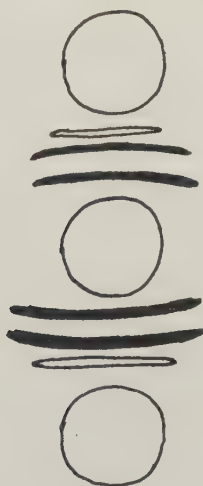


Figure 36 - Immun-sérum prélevé 7 jours après la troisième injection (5 mg)

Il faudra une quatrième injection de 5 mg d'extrait, effectuée un mois après, pour obtenir un plus grand nombre d'arcs, mais certains d'entre eux sont diffus. Nous avons fait des essais avec des immun-sérums prélevés les sixième, douzième et treizième jour après cette injection de rappel, nous schématisons ci-après un de nos résultats à titre d'exemple.

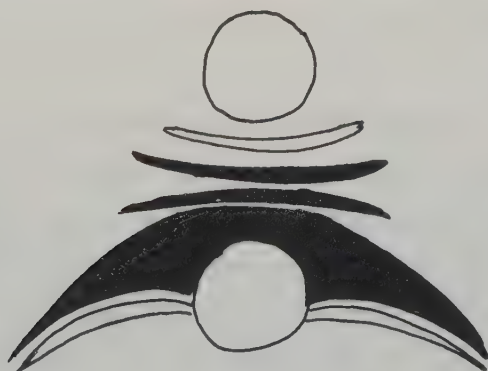


Figure 37 - Immun-sérum prélevé 6 jours après la quatrième injection (5 mg)

Second protocole d'immunisation

Les résultats schématisés ci-dessous ont été obtenus avec des immun-sérums résultant de l'injection de 5, puis de 10 mg de protéines musculaires d'huître portugaise (partie transparente) c'est à dire avec des immun-sérums obtenus par le second protocole.

Les immun-sérums prélevés une semaine environ après la première injection donnent un léger arc de précipitation, témoignage de la réactivité de l'animal ; ce fait apparait sur la figure 38 où nous observons un arc de précipitation qui subsistera jusqu'à la deuxième injection, 28 jours plus tard. Nous avons déposé dans le puits central, un immun-sérum d'huître portugaise, prélevé 9 jours après la première injection, tandis que le puits à droite contient l'extrait de cette même huître.

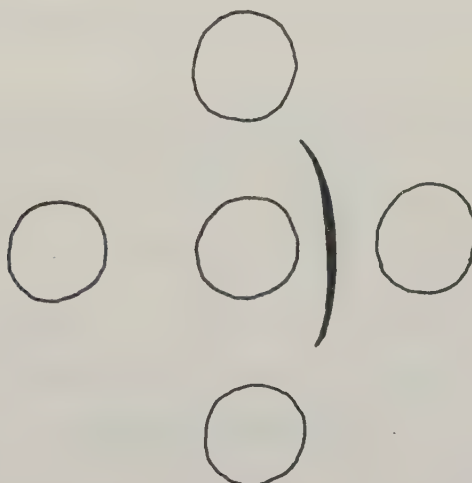


Figure 38 - Immun-sérum prélevé 9 jours après la première injection (5 mg)

Avec les immun-sérums prélevés après la deuxième injection, la quantité d'anticorps produite est beaucoup plus importante, ce qui se traduit par un grand nombre d'arcs de précipitation ainsi qu'en témoigne la figure 39 et la photographie 15 de la planche hors-texte V. Nous avons déposé dans le puits inférieur, l'immun-sérum du même lapin, prélevé 8 jours après la deuxième injection, tandis que le puits supérieur contient l'extrait de cette même huître.

Les arcs obtenus comprennent un arc de précipitation épais et intense situé près du centre, trois arcs plus fins et plus rectilignes et un arc plus pâle proche de l'extrait.



Figure 39 - Immun-sérum prélevé 8 jours après la deuxième injection (10 mg)

Diverses expériences effectuées avec des immun-sérums prélevés à partir du quatrième jour après la deuxième injection nous avaient montré que les arcs sont très nets 8 à 10 jours après cette deuxième injection, ils s'atténuent ensuite mais persistent pendant longtemps.

Une injection de rappel fera réapparaître les arcs de précipitation très nets, et ceci quel que soit le temps écoulé (de trois semaines à trois mois) depuis la deuxième injection.

Ces résultats nous ont amené à choisir le second type d'immunisation. En effet, le premier type nécessite un temps beaucoup plus long, une quantité de protéines plus importante et les résultats sont moins satisfaisants.

4) Quantités d'extraits et d'immun-sérums à utiliser

En double diffusion, suivant la méthode d'Ouchterlony, la netteté des arcs de précipitation, donc leur identification, dépend de la quantité d'antigènes et d'anticorps mis en présence.

Or, nous avons constaté que le taux d'anticorps formé varie d'un animal à l'autre, malgré l'utilisation de lapins de même provenance et de race pure.

Pour chaque immunisation, nous avons recherché les quantités optimales d'extrait et de sérum qui donneront les meilleures images.

Nous avons dû faire de nombreux essais. Nous rapporterons ici à titre d'exemple, une seule de ces expériences, effectuée avec un extrait protéique congelé et un immun-sérum également congelé.

Les résultats présentés sur la figure 40 et la photographie 16 de la planche hors-texte V concernent les différents arcs obtenus en plaçant 25 μ l d'immun-sérum anti-huître portugaise dans le puits central et des quantités variables d'extrait d'huître portugaise dans les puits périphériques : 5 - 10 - 15 - 20 - 25 et 30 μ l.

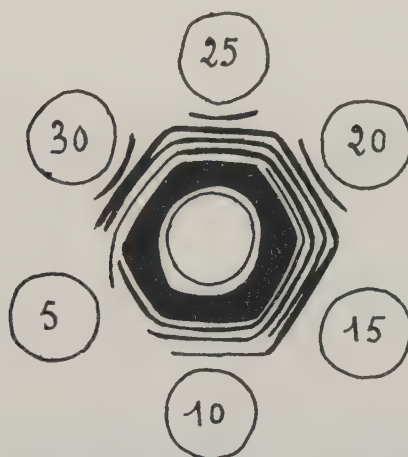


Figure 40 - Immun-sérum au centre et quantités variables d'antigènes dans les puits périphériques

Avec 5 μ l d'extrait peu d'arcs apparaissent, avec 15 à 20 μ l beaucoup d'arcs sont nets, tandis qu'avec 30 μ l d'extrait certains arcs se confondent.

Dans cette expérience, pour 25 μ l d'immun-sérum, il faut donc utiliser de 20 à 25 μ l d'extrait.

5) Intérêt des immun-sérums lyophilisés

L'avantage de la lyophilisation appliquée aux extraits de muscles d'Ostreidae avait été souligné par P. MORE ; nous avons voulu appliquer la même technique aux immun-sérums pour faciliter leur conservation et permettre leur concentration.

Mais il fallait vérifier que la qualité immunitaire des sérums n'était pas altérée par lyophilisation.

Nous avons effectué plusieurs essais en double diffusion et en immuno-électrophorèse et nous avons pu constater que le nombre d'arcs obtenu était le même avec des immun-sérums congelés ou lyophilisés, repris par un égal volume d'eau, donc non concentrés ; la qualité immunitaire est bien conservée.

Nous avons ensuite comparé les images obtenues en double diffusion en utilisant un immun-sérum congelé et le même sérum lyophilisé, repris au demi donc concentré.

La figure 41, schéma de la photographie 17 de la planche hors-texte V, montre deux séries de trois puits :

La série de gauche présente un puits central avec 25 μ l d'immun-sérum anti-huître portugaise (prélevé 8 jours après le rappel), sérum lyophilisé et concentré. Le puits supérieur a reçu 25 μ l d'extrait d'huître portugaise, le puits inférieur, 15 μ l.

La série de droite présente un puits central avec 25 μ l du même sérum, non lyophilisé, les puits supérieur et inférieur ont reçu également 25 et 15 μ l d'extrait.

Les arcs obtenus avec le sérum lyophilisé et concentré sont plus "dégagés" du puits central, plus nets car plus fins ; on constate ainsi que l'arc épais bordant le puits central contenant du sérum congelé n'en masquait pas d'autres. De plus, avec le sérum lyophilisé, certains arcs sont mieux individualisés et de nouveaux arcs, éloignés du puits central, apparaissent avec 25 μ l d'extrait.

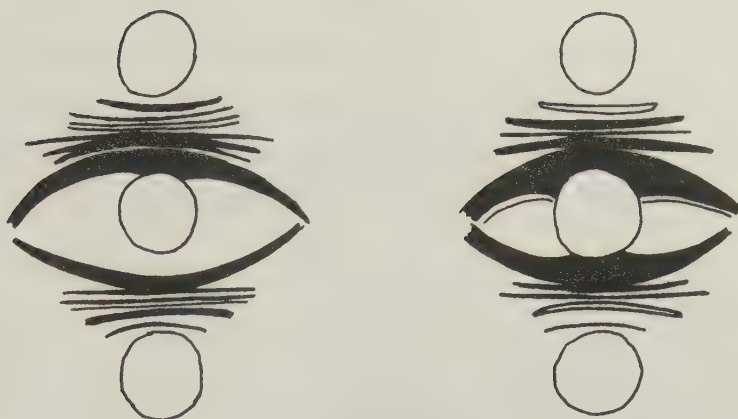


Figure 41 - Immun-sérums au centre, lyophilisé à gauche, non lyophilisé à droite.

Antigènes dans les puits latéraux.

La concentration présente donc parfois un certain intérêt en double diffusion, cet intérêt s'avère plus important en immuno-électrophorèse, ce qui apparaîtra dans nos expériences comparatives entre diverses Ostreidae.

D - EXPERIENCES COMPARATIVES ENTRE DIVERSES OSTREIDAE

En possession de techniques valables, nous donnant des résultats reproductibles, nous avons abordé l'étude immunologique comparative des extraits d'huîtres que nous possédons.

Notre étude concerne deux genres *Crassostrea* et *Ostrea*, et pour le genre *Crassostrea*, quatre espèces : *C. angulata*, *C. gigas*, *C. gasar* et *C. virginica*.

Chaque série d'expériences comporte de nombreux essais dont les résultats sont similaires. Nous schématiserons pour chaque série les images caractéristiques les plus nettes.

Première série d'expériences

La figure 42 et la photographie 18 de la planche hors-texte V représentent une double diffusion mettant en présence les quatre *Crassostrea* étudiées. Au centre, 25 µl d'immun-sérum congelé anti-*C. angulata* et, dans les puits périphériques, des extraits congelés de *C. angulata* alternent avec des extraits de *C. gigas*, de *C. gasar* ou de *C. virginica*.

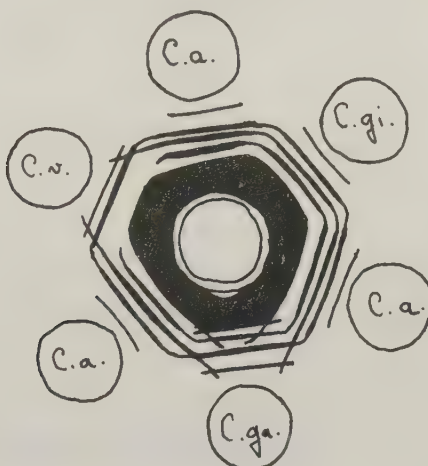


Figure 42 - Immun-sérum anti-*C. angulata* au centre
Extraits des quatre espèces de *Crassostrea* à la périphérie

Le sérum a donné cinq zones de précipitation contre l'extrait correspondant de *C. angulata* et cinq zones identiques contre l'extrait de *C. gigas* ; certaines de ces zones sont toutefois d'intensité différente. Par contre, nous avons respectivement quatre et trois zones de précipitation contre les extraits de *C. gasar* et *C. virginica* ; deux de ces zones sont communes avec celles de *C. angulata*.

Deuxième série d'expériences

Toujours en double diffusion, nous avons disposé de la même façon, divers extraits d'huîtres dans les puits périphériques : *Ostrea edulis*, *C. gasar*, *C. gigas* alternant avec des extraits de *C. angulata*, leur emplacement étant indiqué sur la figure 43.

Le sérum anti-*C. angulata* ne révèle pas de zone de précipitation contre l'extrait d'*Ostrea edulis* ; tandis que les zones indiquées précédemment se retrouvent pour les *Crassostrea*.

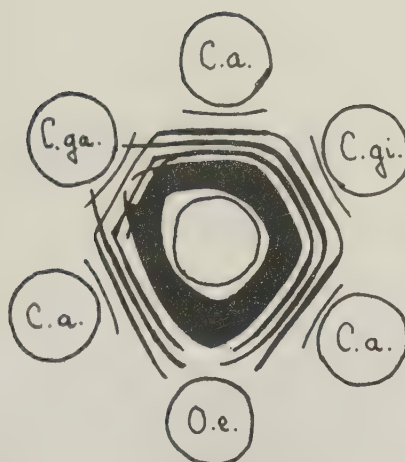


Figure 43 - Immun-sérum anti-*C. angulata* au centre

Trois extraits de *Crassostrea*, un extrait d'*O. edulis* à la périphérie.

Troisième série d'expériences

La figure 44 représente une immuno-électrophorèse. La migration de 25 μ l d'extrait congelé de *C. gigas* dans le puits supérieur et de 25 μ l d'extrait congelé de *C. angulata* dans le puits inférieur, est suivie d'une diffusion de sérum congelé anti-*C. angulata* dont 0,25 ml ont été déposés dans la gouttière centrale

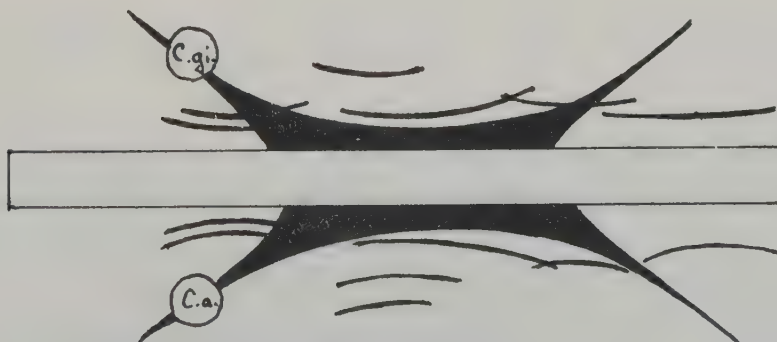


Figure 44 - Immun-sérum congelé anti-*C. angulata* dans la gouttière centrale. Comparaison des extraits de *C. angulata* (C.a.) et de *C. gigas* (C.gi.)

Nous observons de grandes ressemblances entre les deux extraits, un gros arc de précipitation occupe une grande partie de la migration et un certain nombre de petits arcs sont répartis tout le long de la gouttière.

Quatrième série d'expériences

La figure 45 et la photographie 19 de la planche hors-texte V représentent une immuno-électrophorèse effectuée avec les mêmes extraits mais avec un sérum anti-*C. angulata* lyophilisé et repris au demi. La concentration du sérum conduit à un nombre d'arcs plus élevé, ces arcs sont plus nets et la plupart se retrouvent pour les deux espèces. Cependant nous notons un arc supplémentaire dans la zone de migration rapide pour *C. gigas* tandis qu'une zone de précipitation dans la partie moyenne de la migration existe seulement chez *C. angulata*.

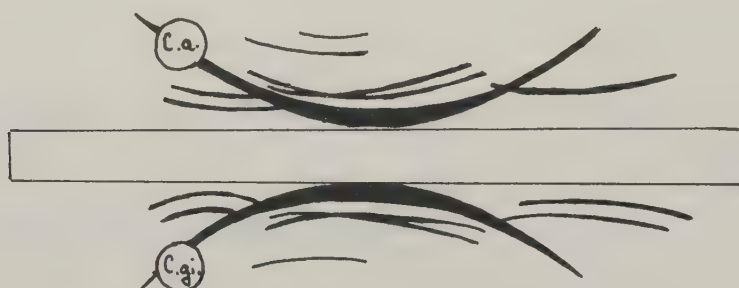


Figure 45 - Comparaison des extraits de *C. angulata* et de *C. gigas* avec le même immun-sérum concentré.

L'examen des figures 44 et 45 montre bien l'intérêt de l'utilisation d'immun-sérums concentrés, qui permet une meilleure comparaison entre les espèces d'huîtres.

Cinquième série d'expériences

Nous avons également effectué des immuno-électrophorèses en faisant migrer les extraits de *C. gasar* et *C. virginica* que nous avons mis en présence d'un sérum lyophilisé anti-*C. angulata*.

La figure 46 schématise l'immuno-électrophorèse avec un extrait de *C. gasar* dans le puits supérieur et un extrait de *C. angulata* dans le puits inférieur et un immun-sérum anti-*C. angulata* dans la gouttière centrale. Nous observons de grandes différences entre les extraits : *C. gasar* ne possède pas l'arc très intense de *C. angulata* mais par contre présente un très grand nombre d'arcs tout le long de la gouttière.

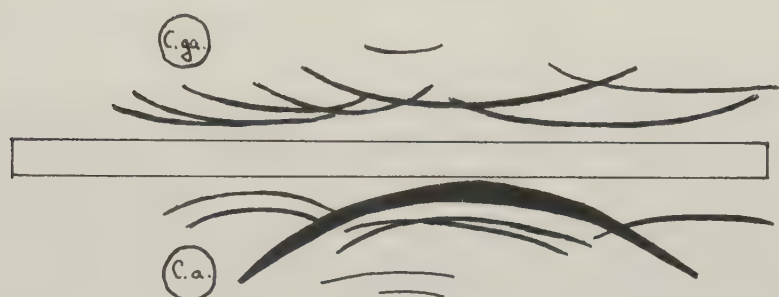


Figure 46 - Comparaison des extraits de *C. gasar* (C.ga.) et de *C. angulata* (C.a.)

Sixième série d'expériences

Il en est de même lorsque l'on analyse l'extrait de *C. virginica* (figure 47).

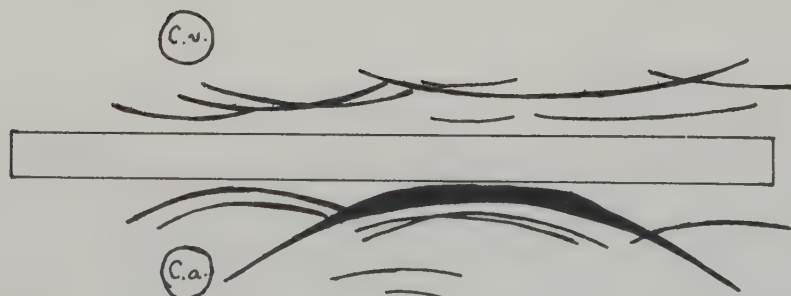


Figure 47 - Comparaison des extraits de *C. virginica* (C. v.) et de *C. angulata* (C. a.)

Sur les cinq espèces d'huîtres étudiées, nous soulignons les grandes différences qui existent sur le plan immunologique entre les deux genres *Crassostrea* et *Ostrea*. Parmi les espèces de *Crassostrea*, *C. angulata* donne des images immunologiques différentes de celles de *C. gasar* et *C. virginica*.

Par contre, il est remarquable de constater des ressemblances profondes entre *C. angulata*, l'huître portugaise et *C. gigas*, l'huître japonaise. Ces deux espèces apparaissent donc sur le plan immunologique très proches l'une de l'autre.

Nous n'avons pas pu comparer ces résultats à ceux de NUMACHI qui concernent des tests d'absorption et non des tests de double diffusion et d'immuno-électrophorèse.

Q U A T R I E M E P A R T I E

METHODES ENZYMOLOGIQUES

METHODES ENZYMOLOGIQUES

La plupart des protéines solubles du muscle adducteur sont de nature enzymatique. Désireux de les identifier et d'en préciser les modalités d'action physiologique, nous avons abordé l'étude des enzymes essentielles de la contraction musculaire, notamment de l'adénylate kinase et de l'arginine kinase, enzymes qui règlent en partie le métabolisme énergétique. Plusieurs méthodes de détermination de leur activité sont actuellement utilisées, nous préciserons la technique appliquée dans nos expériences.

A - GENERALITES SUR L'ADENYLATE KINASE ET L'ARGININE KINASE

1) Caractères et intérêt de ces enzymes

a) adénylate kinase

L'adénylate kinase (ATP : AMP phosphotransférase EC.2.7.4.3.) a été découverte dans le tissu musculaire, en 1943, par COLWICK et KALCKAR (32). On l'a, de ce fait, longtemps appelée myokinase.

L'enzyme du muscle squelettique de lapin a été particulièrement étudiée. Purifiée, cristallisée, ses propriétés physico-chimiques et cinétiques ont été étudiées par NODA, et KUBY (115)(117), CALLAGHAN et WEBER (19)(20) et par MAHOWALD, NOLTMANN et KUBY (89).

Le caractère ubiquitaire de l'adénylate kinase a vite été reconnu. On l'a découverte et étudiée dans la plupart des tissus de Mammifères : foie de porc (27), érythrocytes de l'homme, du cheval, du boeuf et du porc (158) (23), plasma et plaquettes du sang humain (60), cristallin du veau (76), placenta humain (24), muqueuse intestinale (9) et autres tissus humains : TODD et Coll. (162).

Quelques travaux concernent les Vertébrés inférieurs : l'enzyme du muscle cardiaque de la tortue - KANE et Coll. (70) - et l'enzyme du muscle squelettique de la carpe - NODA et Coll. (120).

L'adénylate kinase des Invertébrés a peu retenu l'attention. On note cependant les travaux de MILLS et COCHRAN (97) sur l'enzyme du muscle thoracique de la blatte et de ANDO et NODA sur le muscle de calmar (4).

Enfin, l'adénylate kinase a été mise en évidence dans de nombreux microorganismes (123). On la trouve dans la levure de boulanger où elle a donné lieu à de nombreux travaux (28) (153) (154) (74).

Les chercheurs ont tenté de préciser la localisation intracellulaire de l'adénylate kinase. DE DUVE (45) dans une revue générale sur les enzymes, souligne que sa distribution varie beaucoup d'un tissu à l'autre.

Nous citerons pour mémoire la répartition dans les érythrocytes dont le cytoplasme possède une activité très élevée alors que la membrane est dépourvue d'activité adénylate kinasique (25) et nous retiendrons sa localisation dans le muscle et le foie.

Dans le muscle squelettique de l'homme et de la souris, l'adénylate kinase est presque exclusivement cantonnée dans le sarcoplasme, d'après PARK et PENNINGTON (127). Pour le muscle de lapin, mitochondries, fraction myofibrillaire et surnageant contiennent respectivement 2 %, 6 % et 92 % de l'activité adénylate kinase totale selon KENDRICK-JONES et PERRY (73).

Quant au foie, la majeure partie de l'activité est associée à la fraction mitochondriale (94). CRISS (35), étudiant le foie de rat, a localisé l'activité au compartiment mitochondrial externe.

En résumé, la localisation est presque exclusivement sarcoplasmique pour le muscle et surtout mitochondriale pour le foie.

Plusieurs adénylate kinases ont été isolées suivant les tissus ; elles peuvent différer sur le plan structural, particulièrement au niveau des groupements SH ou S-S. Ainsi, l'enzyme du muscle squelettique des Vertébrés possède deux groupements sulfhydriles libres essentiels, alors que l'enzyme des mitochondries du foie de boeuf ne contient pas de groupement sulfhydrile libre, mais probablement deux ponts disulfures essentiels (95).

Ces adénylate kinases résistent plus ou moins à la chaleur et à l'acidification (31).

Ces mêmes enzymes peuvent différer également par la valeur de leur poids moléculaire. Celle de lapin(118), par exemple, a un poids moléculaire de 21 000, calculé à partir des constantes de diffusion et de sédimentation. Pour le muscle de calmar, la valeur obtenue par chromatographie d'exclusion-diffusion et par électrophorèse en gel de polyacrylamide (4) est de 44 000. Pour le cristallin de veau, elle est voisine de 21 000, valeur trouvée par chromatographie d'exclusion-diffusion (76). Il en est de même pour l'enzyme des mitochondries du foie de boeuf, dont la valeur a été calculée à partir des coefficients de sédimentation et de diffusion (94). Pour l'enzyme de la levure de boulanger, le poids moléculaire est de l'ordre de 41 000 (28).

Le problème est vraisemblablement plus complexe. Nous rapportons quelques travaux essentiels sur les différences de poids moléculaire . CRISS et Coll. (36) ont étudié le poids moléculaire de l'adénylate kinase III, isoenzyme du foie de rat ; ils ont trouvé les chiffres de 23 000, 46 000 et 68 000, ce qui fait penser à un système d'agrégation réversible.

En utilisant les méthodes électrophorétiques, divers chercheurs ont mis en évidence des formes multiples de l'adénylate kinase. Ils ont constaté des différences de mobilité de ces enzymes suivant les espèces étudiées. SCOPES (150) a comparé en gel d'amidon les diverses enzymes musculaires de nombreuses espèces animales. KLETHI et MANDEL (77) en gel d'acrylamide-agarose ont étudié les différentes adénylate kinases ou isoenzymes des tissus de rat.

Chez l'homme, KHOO et RUSSEL (75), par gel d'amidon, ont également identifié diverses isoenzymes du muscle, du foie, du rein, du coeur, de la rate, du cerveau et du sang. FILDES et HARRIS (49) ont étudié les isoenzymes adénylate kinasiques des érythrocytes et les ont groupées en trois phénotypes.

L'intérêt de l'adénylate kinase sur le plan systématique, phylogénétique, génétique, ontogénétique et physiologique doit être souligné. Cette enzyme peut servir de critère biochimique de classification des genres et espèces. Elle intéresse à la fois la phylogénèse et la génétique comme l'illustrent les études faites sur des groupes de population en Israël (156) et sur certaines familles présentant des déficiences héréditaires d'adénylate kinase érythrocytaire (155). Sur le plan ontogénétique, nous citerons quelques travaux. Pour HOMMES et Coll. (64) l'activité adénylate kinase du foie de rat augmente de dix fois pendant la période comprise entre 8 jours avant la naissance et 30 jours après la naissance. Pour KENDRICK-JONES et PERRY (73) dans les muscles de Vertébrés, l'activité adénylate kinase augmente rapidement, immédiatement avant ou après la naissance, suivant les espèces et les muscles considérés.

Nous rappellerons l'importance de l'adénylate kinase dans le domaine de la physiologie musculaire. Il existe des différences métaboliques entre les muscles blancs à contractions rapides, se fatiguant très vite et les muscles rouges à contraction plus lente mais plus soutenue. RAGGI et Coll. (134) ont montré en effet que l'activité adénylate kinase et l'activité créatine kinase du muscle squelettique blanc du lapin, sont très supérieures aux activités du muscle rouge. GOLDSPIK et Coll. (55) sont arrivés à des conclusions identiques en étudiant les muscles blancs et rouges du rat.

Sur le plan de la physiopathologie, des travaux similaires ont été faits sur l'adénylate kinase des muscles de souris atteintes de myopathie héréditaire (130) et sur l'adénylate kinase de l'homme atteint de dystrophie musculaire progressive (146). Ils ont décelé une nette diminution de l'activité enzymatique, ce qui confirme l'intérêt de ces recherches.

CRISS (35) fait remarquer que l'adénylate kinase doit jouer un rôle dans la régulation du métabolisme cellulaire. De nombreuses enzymes sont stimulées ou inhibées par les variations de concentration cytoplasmique en ATP, AMP ou ADP comme le signale ATKINSON (5). Or, l'adénylate kinase catalyse l'équilibre entre ATP, AMP et ADP, elle peut donc indirectement contrôler et réguler diverses voies métaboliques cellulaires.

Cette enzyme constitue en outre une des voies de régénération de l'ATP ; celle-ci est consommée lors de la contraction musculaire par hydrolyse en ADP et Phosphate inorganique par l'ATPase. Secondairement par une réaction de transphosphorylation, catalysée par l'adénylate kinase, l'ADP donne de l'ATP et de l'AMP.

Cette régénération d'ATP ramène dans les limites normales la teneur du muscle en ADP formé pendant la contraction musculaire et dont un excès inhibe le relâchement musculaire et perturbe le processus de libération du Ca^{++} à partir des citernes de reticulum sarcoplasmique (88). L'ADP est en outre inhibiteur de la myosine ATPase (113) et son accumulation serait préjudiciable au fonctionnement musculaire. Ces notions rapportées par MOLDOVEANU (98) concernent le muscle squelettique de grenouille.

b) arginine kinase

L'arginine kinase (ATP : L-arginine phosphotransférase EC 2.7.3.3.) est une des sept ATP : guanidinophosphotransférases actuellement connues. Son substrat est l'arginine et la phosphoarginine, phosphagène correspondant.

Découverte par LOHMANN en 1935 (84) dans un extrait musculaire de crabe, elle a été isolée sous forme cristalline* par SZORENYI et Coll. (154), en 1949, et par ELODI et SZORENYI (46) en 1956, à partir d'extraits musculaires de crabes d'eau douce (*Potamobius leptodactylus* et *P. astacus*).

De 1957 à 1969, de nombreux chercheurs ont utilisé les tissus musculaires de Crustacés, très riches en arginine kinase, pour isoler, purifier et parfois cristalliser cette enzyme : une équipe australienne de MORRISSON, GRIFFITHS et ENNOR (112)(48) à partir de *Jasus verreauxi* et de *Cherix albidus*, une équipe française de PRADEL, KASSAB, REGNOUF, NGUYEN VAN THOAI (132) et une équipe britannique de VIRDEN, WATTS et BALDWIN (170) sur *Homarus vulgaris*, une équipe américaine de BLETHEN et KAPLAN (12)(13) en partant de *Homarus americanus*, *Callinectes sapidus* et *Eupagurus bernardus*.

* L'arginine kinase fut la première enzyme isolée sous forme cristalline chez les Invertébrés.

Mais, depuis longtemps, on avait décelé l'existence d'arginine kinase chez d'autres Invertébrés : en 1936, LOHMANN (85) dans le muscle de l'*Octopus* (Mollusque céphalopode) et en 1937, BALDWIN et NEEDHAM (8) chez un oursin (muscles de la lanterne d'Aristote de *Sphaerechinus granularis*). Par la suite, l'enzyme a été rencontrée chez beaucoup d'autres Invertébrés relevant des embranchements, classes ou ordres divers : Annélides (169)(161), Mollusques Lamellibranches (164)(169)(111), Mérostromes, Arachnides, Insectes (13)(21). Il en a été de même chez les Echinodermes, Urocordés, Céphalocordés, "groupes charnières" entre les Vertébrés et les Invertébrés, qui ont particulièrement retenu l'attention (58)(169)(161)(110), car l'arginine kinase n'a jamais été identifiée chez les Vertébrés.

On la trouve également chez certains Protozoaires notamment *Stentor coeruleus* (177).

L'arginine kinase se rencontre non seulement dans le tissu musculaire d'Invertébrés, mais dans beaucoup d'autres tissus. BLETHEN et KAPLAN (13) l'ont mise en évidence chez le Homard, dans les muscles, la glande verte, les branchies, les ganglions cérébroïdes, l'intestin et la glande digestive ; le muscle abdominal et les ganglions cérébroïdes par exemple ont une activité similaire, supérieure à celle des autres tissus.

L'enzyme étudiée est l'enzyme cytoplasmique et, à notre connaissance, aucune autre localisation intracellulaire n'a été précisée.

L'étude des propriétés, des mécanismes d'action, des sites actifs des arginine kinases d'origines diverses, ainsi que l'estimation de leur poids moléculaire ont mis en évidence des caractères communs et différentiels.

L'enzyme musculaire des Arthropodes, notamment des Crustacés, a un poids moléculaire voisin de 40 000 (12)(13). ELODI, SZORENYI (46) et l'Ecole française (132)(159) indiquent une valeur voisine de 43 000 tandis que l'Ecole britannique trouve seulement 37 000 (171).

L'arginine kinase des Mollusques a un poids moléculaire de 40 000. Mais, dans les tissus musculaires des Eulamellibranches, coexistent deux arginine kinases de poids moléculaires 40 000 et 80 000 (110)(178).

L'enzyme musculaire d'Oursins de certains Annelides et de *Sipunculus nudus* a également un poids moléculaire de 80 000 (161)(110)(80). Par contre, pour deux Annelides Polychètes marins (*Sabella pavonina* et

Spirographis spallanzani , le poids moléculaire est de 160 000 donc quadruple de celui trouvé chez les Crustacés (138)(139).

On cherche à élucider la signification biologique de ces différentes valeurs de l'arginine kinase des muscles d'Invertébrés, présentées comme types I, II et III par l'école française.

Des études électrophorétiques ont mis en évidence des formes multiples de l'arginine kinase dans les extraits musculaires de *Cardium edule*, Mollusque Lamellibranche (110), de *Limulus polyphemus*, Merostome et de divers Arachnides (13)(11). Ces formes n'ont pas été retrouvées par BLETHEN et KAPLAN (13) à partir d'extraits musculaires de Crustacés et d'Insectes.

Il est remarquable de constater que la majorité des recherches sur l'arginine kinase, et les autres ATP : guanidinophosphotransférases des Invertébrés, se déroule dans une optique phylogénétique.

En effet, "on a proposé au début de l'étude des phosphagènes, de diviser les animaux en deux grands groupes, les Vertébrés possédant la phosphocréatine et les Invertébrés caractérisés par la phosphoarginine". [FLORKIN (51)]. En fait, la phosphocréatine existe aussi bien chez les Echinodermes, les Annelides et les Eponges que chez les Vertébrés. A l'heure actuelle, on connaît deux à sept phosphagènes et l'on peut citer des Invertébrés où coexistent de deux à trois types de phosphagènes.

Les chercheurs se sont alors tournés vers l'étude et la comparaison des diverses ATP : guanidinophosphotransférases, enzymes "déterminantes" des phosphagènes. Pour VIALA, ROBIN et NGUYEN VAN THOAI (168), un ensemble de faits démontre une homologie de structure entre diverses ATP : guanidinophosphotransférases musculaires qui pourraient dériver d'un gène ancestral commun. Cette homologie se reflète en partie dans les propriétés immunologiques de ces enzymes. MORELAND, WATTS et VIRDEN (110) ont étudié cette évolution phylogénétique au niveau des Echinodermes.

Les travaux menés dans une optique physiologique sont moins nombreux.

Pourtant, l'arginine kinase, très abondante dans le tissu musculaire de nombreux Invertébrés apparaît essentielle pour son métabolisme énergétique. Elle y joue le même rôle que la créatine kinase chez les Vertébrés. Lors de la contraction musculaire, lorsque l'ATP est hydrolysé par l'ATPase en ADP et Phosphate inorganique, l'arginine kinase est capable de rephosphoryler rapidement l'ADP en ATP à partir de la phosphoarginine.

Divers travaux ont laissé entrevoir l'intérêt de l'étude de l'arginine kinase des tissus musculaires des Mollusques Lamellibranches :

- pour TONOMURA, YAGI et MATSUMIYA (164) ainsi que pour VIRDEN et WATTS (169), l'activité arginine kinase de la partie striée phasique, du muscle adducteur de *Pecten* et *Chlamys* est bien supérieure à celle de la partie lisse tonique,

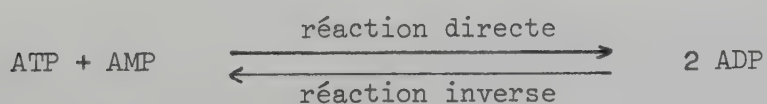
- pour MORELAND et WATTS (110), chez les Eulamellibranches, qui possèdent une enzyme de poids moléculaire 40 000 et une enzyme de poids moléculaire de 80 000, la première serait associée à la fonction tonique et la seconde à la fonction phasique,

- pour MINIHAN NAUSS et DAVIES (114), dans le muscle rétracteur antérieur du byssus de *Mytilus edulis*, en état de "catch", il n'y a pas destruction de phosphoarginine mais resynthèse de celle détruite pendant la période phasique de la contraction.

En conclusion, l'adénylate kinase et l'arginine kinase, enzymes importantes de la contraction musculaire, dont nous avons abordé l'étude, sont en réalité interdépendantes l'une de l'autre. Ultérieurement, nous nous proposons d'étudier d'autres enzymes, telles l'ATPase et l'AMPdéaminase qui interviennent dans le métabolisme adénylique cellulaire, en particulier celui de la cellule musculaire des Mollusques Lamellibranches.

2) Méthodes générales de mesure de l'activité adénylate kinasique

L'adénylate kinase catalyse la réaction suivante :



Sur un plan très général, nous rappelons que l'activité de l'adénylate kinase peut être déterminée dans le sens direct ou dans le sens inverse, que l'ion Mg^{++} est nécessaire pour son activation (119) et que la courbe d'activité en fonction du pH montre un très large maximum centré sur pH 8 tant pour la réaction directe que pour la réaction inverse (116).

Les nombreuses techniques de détermination de l'activité adénylate kinasique peuvent être classées en réactions simples et réactions couplées nécessitant une ou deux réactions enzymatiques auxiliaires.

Certaines techniques sont discontinues car, pour suivre le déroulement de la réaction, il est nécessaire de l'arrêter et de doser les produits de la réaction à des temps déterminés. D'autres techniques permettent de suivre et d'enregistrer de façon continue le déroulement de la réaction ; elles sont particulièrement intéressantes car sont les plus aptes à saisir la vitesse initiale d'une réaction enzymatique.

a) réaction simple

On peut tenter de détecter et mesurer les produits de la réaction directe ou de la réaction inverse.

NODA (115), appliquant le procédé de COHN et CARTER (30), adsorbe les nucléotides formés sur colonne Dowex puis, après élution, les évalue spectrophotométriquement à 257 nm.

On peut arriver au même résultat par chromatographie sur papier (25)(19) ou par électrophorèse. L'évaluation spectrophotométrique des nucléotides peut être avantageusement remplacée, par des mesures de radio-activité si on a besoin de marquer au ^{14}C le ou les nucléotides de départ (95).

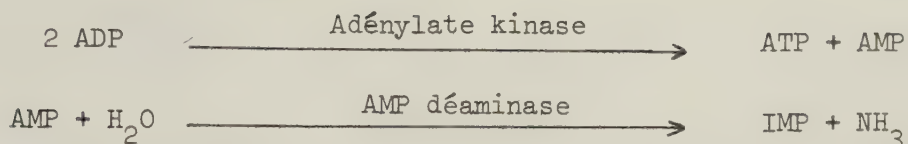
b) réactions couplées

La séparation et l'estimation des produits de la réaction étant laborieuses, on a tenté de transformer un des produits de la réaction en un dérivé dont la formation soit aisément détectable.

On a utilisé dans ce but des réactions couplées à deux et à trois constituants.

- réactions couplées à 2 constituants

. Emploi de l'AMP déaminase

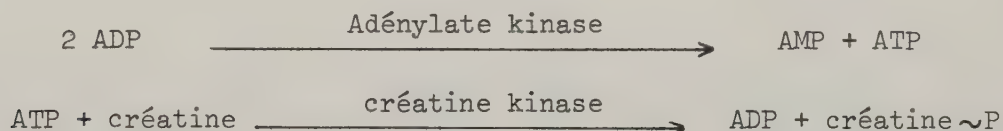


On détecte la formation de AMP par addition de AMP déaminase (69)(31). On peut suivre spectrophotométriquement à 265 nm la désamination de l'AMP qui est accompagnée d'une modification du spectre d'absorption ultra-violet. En effet, à 265 nm, l'extinction moléculaire de l'IMP a une valeur égale à 40 % de celle de l'AMP.

On pourrait éventuellement suivre la libération d'ammoniac, ce qui a d'ailleurs été réalisé par SCHMIDT (147).

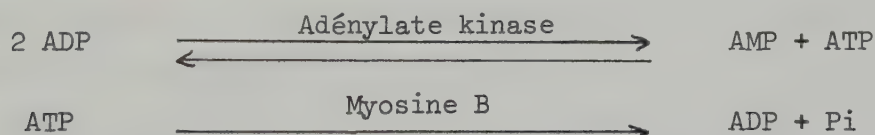
Les deux réactions doivent être réalisées séparément car les pH optima des deux enzymes diffèrent beaucoup. Ceci est un inconvénient.

. Emploi de la créatine kinase



On couple l'activité adénylate kinase avec l'activité créatine kinase, en présence d'un excès de créatine. La phosphocréatine formée est ensuite déterminée par colorimétrie (118)(79).

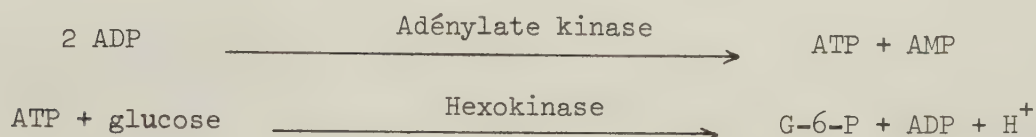
. Emploi de la Myosine-ATPase



On incube l'adénylate kinase avec le substrat qui peut être soit de l'ADP, soit un mélange d'ATP et d'AMP. Au temps désiré, on arrête la réaction dont l'étendue est déterminée en mesurant l'ATP formé ou détruit.

Pour ce faire, on dose colorimétriquement le phosphate inorganique détaché de l'ATP par incubation du mélange réactionnel avec de la Myosine B qui possède une activité ATPasique (16).

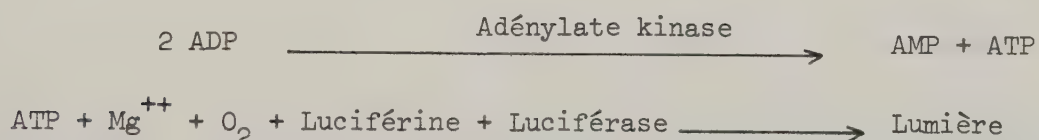
• Emploi de l'hexokinase



On peut coupler adénylate kinase et hexokinase et suivre la réaction en mesurant la libération de CO_2 à partir d'un tampon bicarbonate (méthode manométrique) ou encore en mesurant la disparition du P acido-labile (31).

Il existe bien d'autres méthodes pour saisir la réaction (34). La méthode titrimétrique avec pH-stat permettant d'enregistrer le phénomène en fonction du temps semble très judicieuse (89).

• Emploi du système Luciférine-Luciférase



Comme toute réaction dans laquelle est impliqué l'ATP, la réaction catalysée par l'adénylate kinase peut être suivie par le système luciférine-luciférase. L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration en ATP (26).

Cependant, l'extrait de lanterne de ver luisant semble être très riche en adénylate kinase. Aussi, la méthode ne peut être pratiquée qu'après une purification très poussée de la luciférine et de la luciférase (162) (41) ce qui limite ici son intérêt.

- réactions couplées à 3 constituants

WARBURG (175) a décrit l'utilisation du NAD ou du NADP comme indicateurs optiques de diverses réactions enzymatiques. En effet, les coenzymes nicotiniques réduits ont un pouvoir d'absorption maximum à 340 nm

qui décroît progressivement au fur et à mesure de leur oxydation. Ceci apparaît sur la figure 48 qui représente les spectres d'absorption des formes réduites et oxydées de ces enzymes.

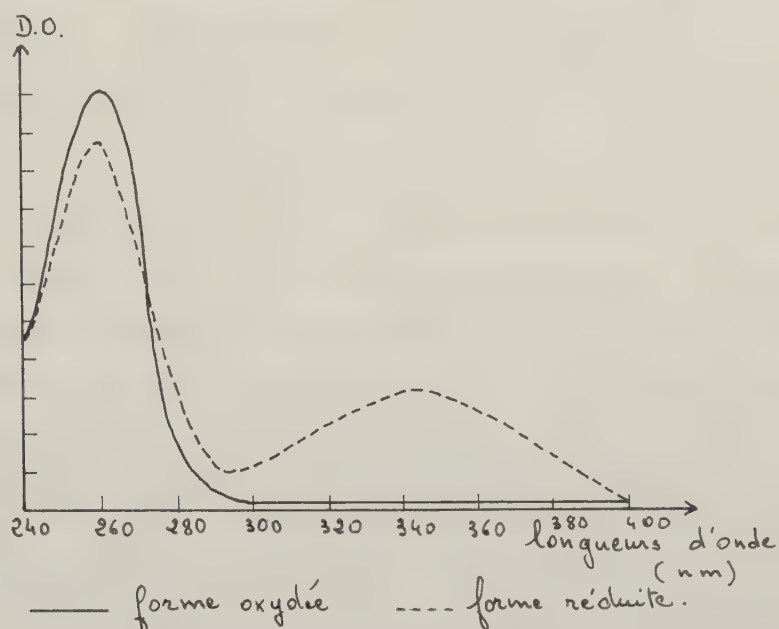


Figure 48 - Spectres d'absorption des formes réduite et oxydée du NAD et du NADP.

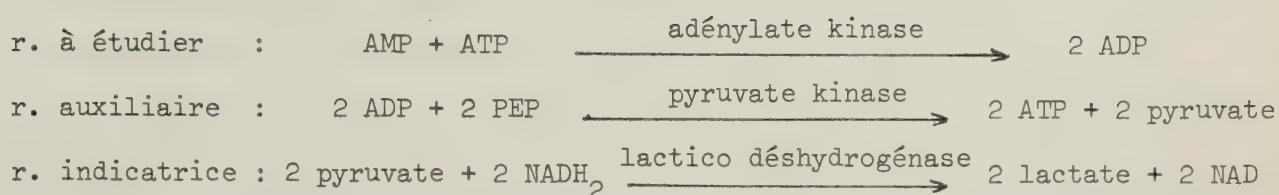
La mesure de la vitesse d'oxydation ou de réduction des coenzymes nicotiniques permet donc d'apprécier l'activité enzymatique qui la détermine.

Le problème est simple si l'enzyme à étudier est une deshydrogénase à coenzyme nicotinique ; il suffit alors d'ajouter le substrat et le coenzyme en excès pour déclencher la réaction.

Mais l'adénylate kinase n'est pas une enzyme à coenzyme nicotinique. Si l'on désire se servir de l'indicateur optique de Warburg pour étudier son activité, il faut faire apparaître dans les termes de la réaction un substrat sensible à l'action d'une deshydrogénase à coenzyme nicotinique.

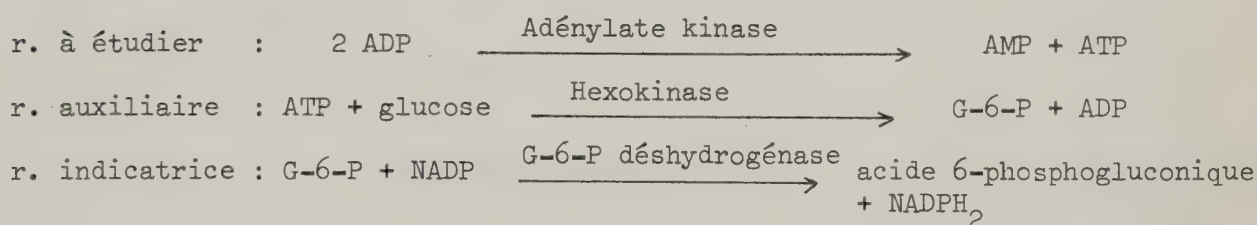
Le produit de la réaction étudiée doit être transformé par une enzyme d'appoint en substrat de deshydrogénase (c'est la réaction auxiliaire). Ce substrat sera ensuite transformé par une deshydrogénase à coenzyme nicotinique avec oxydation ou réduction concomitante de ce coenzyme (c'est la réaction indicatrice). On se trouve donc bien devant un système de réactions couplées à trois constituants et l'on peut opérer ceci en :

- réaction directe



L'activité de l'adénylate kinase est mesurée selon la méthode d'ADAM (3). L'ADP qui provient de l'AMP et de l'ATP sous l'action de l'adénylate kinase, réagit avec du phosphoenolpyruvate en présence de pyruvate kinase. Le pyruvate formé est transformé en lactate sous l'action de la lactico déshydrogénase. Le NADH_2 est oxydé en NAD et l'on suit la décroissance de densité optique par spectrophotométrie à une longueur d'ordre voisine de 340 nm. Nous avons adopté cette méthode pour nos expériences.

- réaction inverse



L'activité de l'adénylate kinase est mesurée selon la méthode d'OLIVER (122). L'ATP provenant de l'action de l'adénylate kinase réagit avec du glucose en présence d'hexokinase. Le glucose-6-phosphate formé est transformé en acide-6-phosphogluconique sous l'action de la glucose 6-phosphate déshydrogénase. Le NADP est réduit en NADPH_2 et l'on suit l'augmentation de densité optique par spectrophotométrie à une longueur d'onde voisine de 340 nm.

Ces réactions couplées à trois constituants sont particulièrement intéressantes. Elles permettent de grandes séries d'analyse ainsi que l'enregistrement du phénomène en continu.

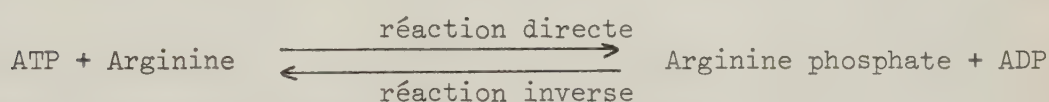
Pour que la réaction indicatrice mesure effectivement l'activité de l'enzyme étudiée, il faut que :

- l'enzyme mesurée soit limitante, donc que son activité soit beaucoup plus faible que celle des enzymes d'appoint ajoutées en grand excès.

- la réaction déshydrogénasique finale soit faiblement réversible dans les conditions du dosage et sa constante de Michaelis basse vis à vis du substrat qui lui est fourni (22).

3) Méthodes générales de mesure de l'activité arginine kinasique

L'arginine kinase catalyse la réaction réversible suivante :



Les techniques de détermination de son activité enzymatique, peu nombreuses, sont également classées en réactions simples et réactions couplées. Elles dérivent des méthodes employées pour la créatine kinase. L'ion Mg^{++} ou l'ion Mn^{++} sont nécessaires pour l'activation de l'arginine kinase. Les pH optima sont généralement de 8,4 - 8,5 pour la réaction directe et de 6,6 - 7,0 pour la réaction inverse (48).

a) Réaction simple

La méthode permettant l'étude de la réaction directe est une modification de celle utilisée par KUBY et Coll. (79). pour la créatine kinase.

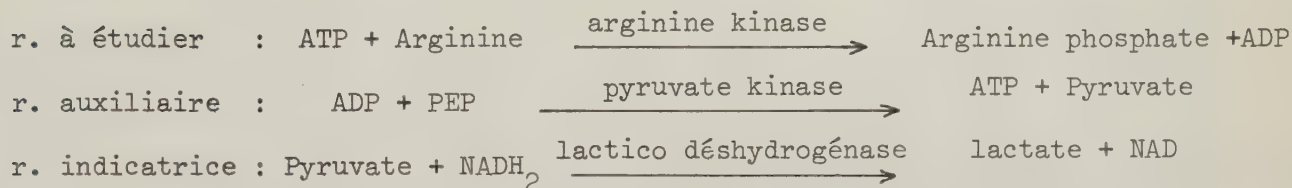
On incube pendant des temps convenables et à une température donnée le mélange enzyme-substrat. On hydrolyse l'arginine phosphate formé et l'on dose le phosphate libéré par des techniques colorimétriques. Les techniques d'hydrolyse et de dosage varient suivant les auteurs (112), (170), (122).

Pour l'étude de la réaction inverse, on opère de façon analogue en partant de l'ADP et d'arginine phosphate (166)(80). L'arginine libérée est dosée selon la méthode colorimétrique de ROSENBERG et Coll. (141).

Contrairement à la créatine phosphate, il est difficile de se procurer de l'arginine phosphate sur le marché commercial, aussi chaque

chercheur doit-il préparer ce substrat, soit par extraction, soit par synthèse. THIEM et ses collaborateurs (160) obtiennent l'arginine phosphate par phosphorylation directe de l'arginine en milieu alcalin. Le produit est cristallisé sous forme de sel de lithium. L'obtention de l'arginine phosphate par synthèse est plus malaisée que celle de la créatine phosphate.

b) Réactions couplées



La technique de WIESMANN et RICHTERICH (179) emploie des réactions couplées à trois constituants permettant de suivre la cinétique enzymatique dans le sens direct. C'est l'homologue de la méthode mise au point par ADAM pour l'étude de l'adénylate kinase. Elle a particulièrement été appliquée par BLETHEN et KAPLAN à l'étude de l'arginine kinase de Homard et de divers Arthropodes (12)(13). Nous l'avons retenue pour nos expériences.

La méthode d'OLIVER que nous avons exposée pour la mesure de l'activité adénylate kinasique, s'applique aussi à la créatine kinase mais nous ne l'avons pas vu appliquée à l'arginine kinase.

Il en est de même pour les méthodes potentiométriques (78), fluorimétriques (145) ou faisant appel au système luciférine-luciférase.

B - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES PROTEINES SOLUBLES DU MUSCLE ADDUCTEUR DES MOLLUSQUES LAMELLIBRANCHES

1) Matériel biologique

L'extraction des protéines solubles est toujours réalisée avec le tampon phosphate de pH 7,5 et de force ionique 0,05 maintes fois cité au cours de ce travail.

Les huîtres, âgées de 4 ans environ, proviennent de la Charente en ce qui concerne *C. angulata* (poids moyen de 75 g) ; les huîtres japonaises

C. gigas, ont été élevées en Charente, leur poids moyen atteint 250 g ; quant aux huîtres plates, *O. edulis*, d'un poids moyen de 84 g, elles viennent de Bretagne.

Les muscles adducteurs sont prélevés en contraction tonique et les deux parties transparente et nacrée sont séparées.

Afin de comparer l'activité enzymatique des muscles d'Ostreidae à celle du muscle de Vertébré, nous avons préparé, avec le même tampon, des extraits de protéines solubles d'un muscle de lapin.

Nous avons utilisé un lapin "gris garenne" de 2 kg 250 provenant d'un Centre d'élevage. L'animal assommé, la gorge immédiatement tranchée, est placé la tête en bas et pour favoriser le saignement, on lui masse le thorax ; il est ensuite dépouillé et vidé rapidement.

Un morceau de muscle *longissimus dorsalis* est prélevé de chaque côté de la colonne vertébrale ; chaque morceau enveloppé dans une feuille de polyéthylène est plongé pendant 20 minutes dans un bain d'eau glacée, ce qui le débarrasse de la plus grande partie du sang qu'il contient encore.

Ensuite, le muscle est déposé sur une plaque de verre, découpé en lanières avec un scalpel, puis avec des ciseaux, en petits morceaux que l'on répartit dans des tubes de verre pour le broyage à l'Ultra turrax. Les centrifugations et la dialyse sont menées de la même manière et avec les mêmes temps que pour les muscles d'huîtres. La dernière centrifugation est suivie d'une lyophilisation. Les extraits sont conservés à + 4° C.

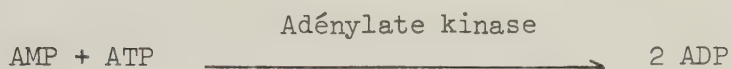
La concentration en protéines des extraits obtenus est de 14,6 mg/ml, donc supérieure à celle des extraits d'huîtres.

Nous avons tenté d'utiliser un hachoir à viande du commerce, mais il provoque un écrasement et non un broyage convenable.

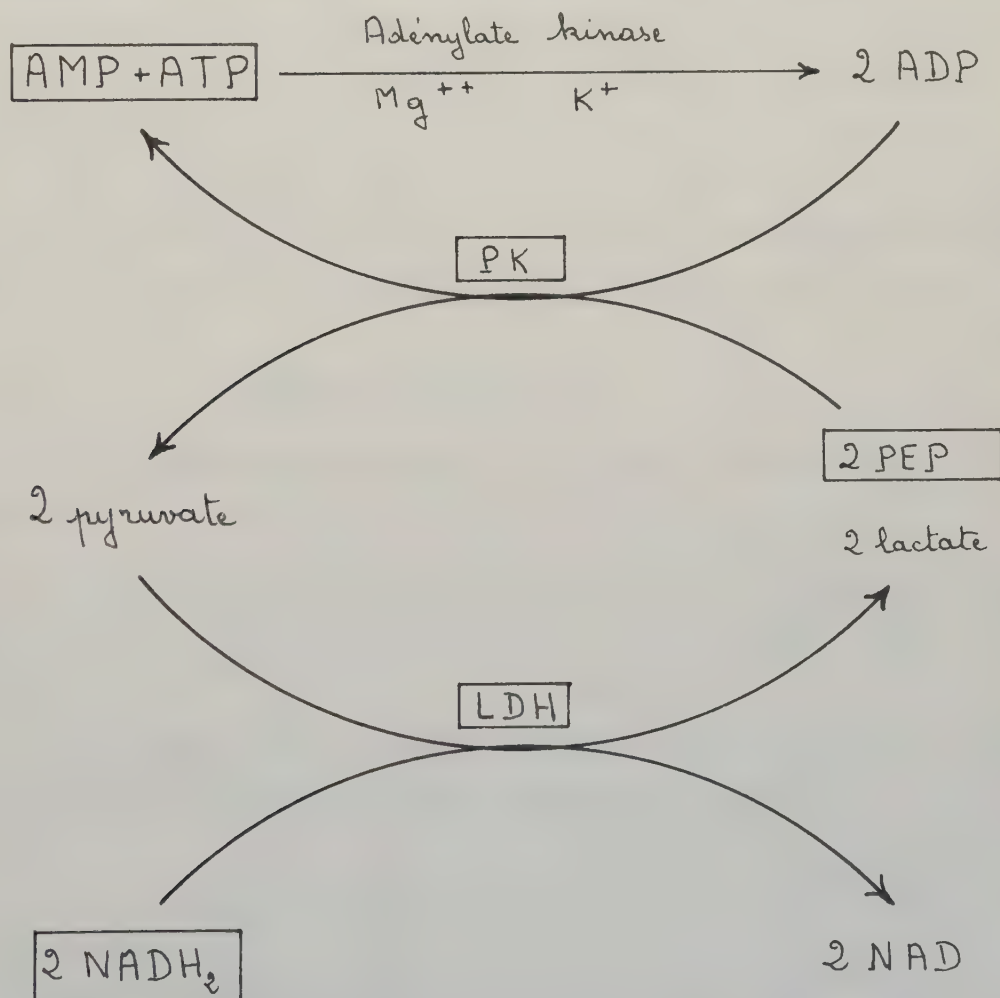
2) Activité adénylate kinasique

a) principe

L'activité adénylate kinasique est étudiée suivant la réaction directe :



La méthode que nous employons dérive de la méthode d'ADAM qui a été énoncée précédemment (Cf p.100). A la réaction à étudier sont couplées la réaction auxiliaire : phosphoénolpyruvate et pyruvate-kinase et la réaction indicatrice : lacticodehydrogénase et nicotinamide adénine dinucléotide réduit, en présence d'ions K^+ et Mg^{++} , selon le schéma suivant :



L'oxydation du NADH_2 en fonction du temps est mesurée à 334 nm, à + 25° C, dans une cuve de 1 cm.

b) appareillage

L'appareil utilisé est le photomètre Eppendorf à passeur automatique*, avec enregistreur et linéarisateur dont nous signalerons quelques caractéristiques. La source lumineuse est une lampe à vapeur de mercure permettant, par un filtre interférentiel approprié, de sélectionner la longueur d'onde désirée, ici 334 nm. Le porte-cuve comporte six positions, il est thermostabilisé par circulation d'eau amenée à la température choisie de + 25° C, à l'aide d'une thermostat Haake*. Les cuves d'une contenance de 3 ml ont un trajet optique de 10 mm ; chaque cuve est alternativement présentée devant le rayon de lumière monochromatique. Lorsque le passeur automatique est utilisé, le temps durant lequel la cuve est présentée pour la mesure, est préétabli en fonction de deux paramètres : la vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur et la longueur d'enregistrement pour chaque cuve ; nous employons une vitesse de déroulement de 1 cm/minute et une longueur d'enregistrement de 0,5 cm, ce qui correspond à 30 secondes pour chaque mesure, le cycle complet se faisant en 3 minutes.

Nous faisons nos lectures avec une densité optique de 1, étalée sur toute l'échelle de l'enregistreur, la commutation automatique s'établissant de 0-1 DO à 1-2 DO. (photographie 20 de la planche hors texte VI).

c) réactifs utilisés **

- Le tampon tris-HCl de pH 7,4 qui doit être conservé à + 4° C a la formule :

tris	6,056 g
HCl 2 N	20,7 ml
eau distillée	q.s.p. 500 ml

- Les solutions suivantes, préparées avec de l'eau distillée, sont conservées à + 4° C et renouvelées une fois par mois :

. KCl	0,8946 g
eau distillée	q.s.p. 50 ml
. MgCl ₂ , 6 H ₂ O	2,4397 g
eau distillée	q.s.p. 50 ml

* Roucaire - 78 - Vélizy

** Enzymes, coenzymes et substrats utilisés proviennent de Boehringer Mannheim France.

- Les solutions de coenzymes et substrats sont préparées la veille du jour de leur utilisation et conservées au congélateur à - 25° C.

. solution de Adénosine-5'-monosphate, sel disodique (AMP) : 134,75 mg sont dissous dans 15 ml d'eau distillée.

. solution de Adénosine-5'-triphosphate, sel disodique (ATP) : 99,85 mg sont dissous dans 10 ml d'eau distillée.

. solution de phosphoénolpyruvate, sel de tricyclohexylammonium (PEP) : 55,90 mg sont dissous dans 10 ml d'eau distillée.

. solution de β -nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit = β -NADH₂, sel disodique (degré de pureté : 2) 24,80 mg sont dissous dans 2,5 ml d'eau distillée.

- Les enzymes utilisées sont les suivantes (enzymes du muscle de lapin) :

. pyruvate kinase (PK) : nous utilisons la suspension commerciale à 10 mg par ml, d'activité spécifique 150 U/mg.

. lactico-déshydrogénase (LDH) : nous utilisons la suspension commerciale à 25 mg pour 5 ml, d'activité spécifique 360 U/mg.

d) mode opératoire

Dans chaque cuve on place, pour chaque réaction enzymatique, 1,9 ml d'un milieu réactionnel comprenant :

tampon	1500	μ l	
solution de KCl	50	μ l	
solution de MgCl ₂ , 6 H ₂ O	50	μ l	
solution de PEP	200	μ l	soit 1,118 mg
solution de NADH ₂	50	μ l	soit 0,496 mg
PK	6,6	μ l	
LDH	16	μ l	

puis sont ajoutés, ensemble ou séparément :

AMP	300	μ l	soit 2,695 mg
ATP	200	μ l	soit 1,997 mg

Ces quantités correspondant pour 1 millilitre de tampon à :
 5 μM de KCl , 5 μM de MgCl_2 , 1 μM de PEP , 0,29 μM de NADH_2 , 4,16 unités de PK ,
 12,5 unités de LDH , 2,25 μM de AMP et 1,37 μM de ATP .

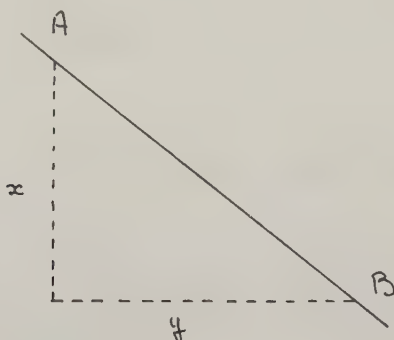
Le volume final dans chaque cuve est de 2,4 ml.

L'oxydation de NADH_2 en fonction du temps se traduit sur l'enregistreur par une diminution de la densité optique.

e) expression des résultats

L'unité adénylate kinasique est la quantité d'enzyme qui forme 1 μM de ADP par minute, dans les conditions des expériences. Ceci est matérialisé par l'oxydation d'une micromole de NADH_2 par minute à $+ 25^\circ \text{C}$.

Pour la mesure d'une activité enzymatique nous mesurons x et y sur le tracé AB inscrit sur l'enregistreur.



Etant donné que la largeur utile du papier enregistreur, qui est de 20 cm, correspond à 1 de D.O., et pour une vitesse de déroulement du papier de 1 cm/minute, la variation de densité optique par minute est donnée par la relation :

$$\Delta E/\text{minute} = \frac{0,05 \times x}{y} \quad (x \text{ et } y \text{ sont mesurés en millimètres})$$

L'activité est exprimée en U.I. par ml de l'extrait, en faisant intervenir le coefficient d'extinction molaire du coenzyme nicotinique qui est de $6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mole}$, le volume total de liquide dans la cuve et le volume de la prise d'essai :

$$\text{UI/ml} = \frac{\Delta E}{334/\text{minute}} \times \frac{\text{volume total dans la cuve en } \mu\text{l}}{\text{volume de la prise d'essai en } \mu\text{l}}$$

Pour exprimer l'activité enzymatique spécifique en U.I. par mg de protéines de l'extrait, il faut diviser le chiffre obtenu en U.I./ml par la teneur en protéines de l'extrait.

Les séries de résultats seront étudiées d'une manière statistique.

f) essais préliminaires

Nous avons d'abord contrôlé l'efficacité du système avec de l'adénylate kinase de lapin, d'activité connue (Boehringer).

Nous avons fait ensuite divers essais afin de vérifier la linéarité de la réaction pour différentes quantités d'extrait.

La figure 49 représente la variation de densité optique ΔE enregistrée par minute en fonction du nombre de μl d'extrait ajoutés au milieu réactionnel, avec un extrait de partie transparente de *C. gigas*. La réaction est linéaire pour des volumes d'extraits de 1 à 5 μl correspondant à des quantités de 5,2 à 26 μg de protéines.

Avant de faire les cinétiques enzymatiques en séries, il est important de mettre, en présence de l'extrait à étudier, les différents constituants du milieu réactionnel pour s'assurer qu'il n'y a pas d'interactions faussant les résultats. Ces essais ont été pratiqués avec un extrait de partie transparente de *C. gigas*.

- Tout d'abord, dans la cuve, nous plaçons le tampon, le $NADH_2$ et l'extrait en respectant les quantités indiquées précédemment. Après agitation, nous constatons que la D.O. ne varie pas sur l'enregistreur, ce qui indique que l'extrait n'a pas d'activité NADoxydasique.

- Dans un autre essai où tous les éléments du milieu réactionnel sont réunis à l'exception de l'ion Mg^{++} , l'addition d'extrait ne provoque aucune réaction. Mais dès que l'on ajoute le $MgCl_2$, la réaction commence ; nous pouvons donc dire que la présence de Mg^{++} est indispensable à la réaction enzymatique.

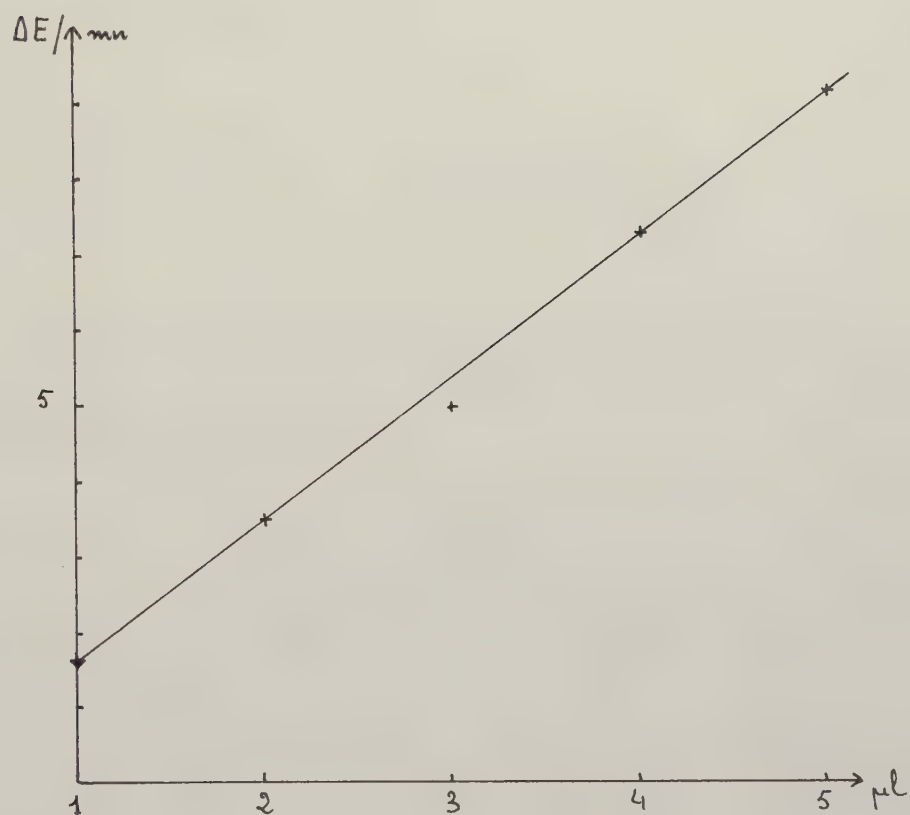
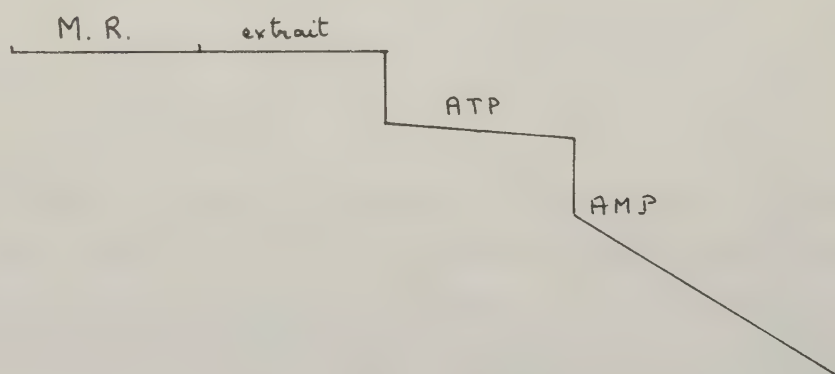


Figure 49 - Variation de la densité optique par minute en fonction du nombre de μl d'extrait ajoutés au milieu réactionnel.

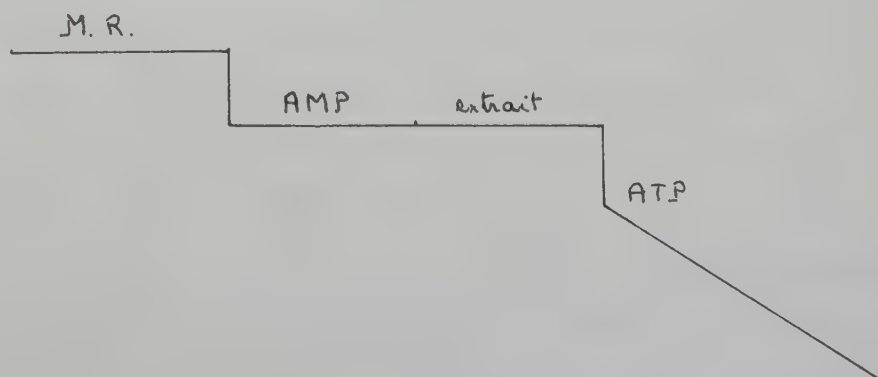
- Dans un troisième essai, dans une cuve, nous avons disposé les quantités indiquées de milieu réactionnel, sans AMP ni ATP, puis l'extrait, et constaté que la densité optique ne change pas ; l'addition d'ATP entraîne une cinétique peu importante traduisant une très faible activité ATPasique comme l'indique le schéma ci-après ; l'AMP ajoutée déclenche vraiment la réaction.

Si l'on ajoute l'ATP au milieu réactionnel dépourvu d'AMP et d'ATP, la D.O. ne change pas. L'addition d'extrait ne produit qu'une faible cinétique.

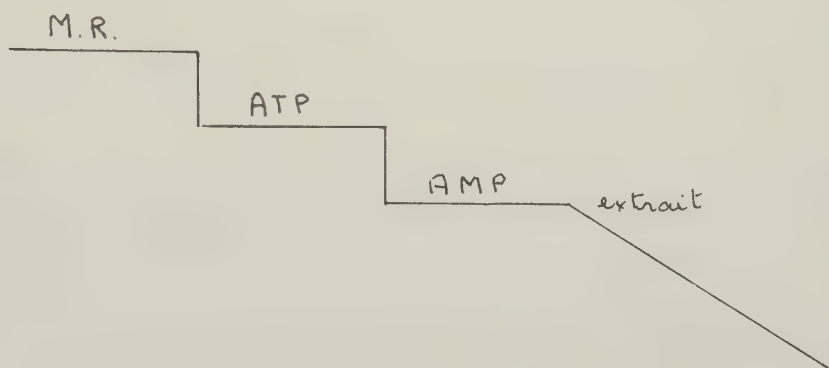
La faible activité ATPasique est due à la présence d'ATPase dans l'extrait ; son importance est négligeable car la variation de densité optique ne dépasse jamais 0,002 par minute.



- Dans une quatrième cuve, contenant le milieu réactionnel toujours sans ATP ni AMP, lorsque l'on ajoute l'AMP, aucune activité enzymatique n'est détectée, il en est de même après addition de l'extrait ; l'addition d'ATP entraînera la réaction enzymatique. L'extrait ne possède donc aucune action sur l'AMP. Ceci est schématisé ci-dessous.



- Dans un dernier essai, au milieu réactionnel sans ATP ni AMP, on ajoute l'ATP et l'AMP, successivement. La densité optique change mais aucune réaction ne se développe ; seule l'addition d'extrait entraînera la cinétique. Une telle réaction se schématise comme suit :



Nous n'avons pas retenu la méthode d'OLIVER qui est la réaction inverse à trois constituants (Cf p.100), les résultats étant difficilement exploitables. En effet, quelle qu'en soit l'origine, la G-6-PDH renferme toujours des traces de glucose déshydrogénase (14) qui provoque une dérive importante dès que le glucose est ajouté à la G-6-PDH, et ceci avant toute addition d'adénylate kinase.

g) étude cinétique

Nous avons alors pu effectuer des séries d'études cinétiques.

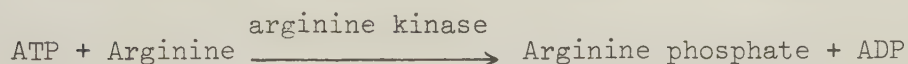
Nous plaçons dans les cuves 1,9 ml de milieu réactionnel, sans ATP ni AMP ; le mélange s'équilibre à + 25° C avant d'être passé à l'Eppendorf, pour vérifier qu'aucune réaction perturbatrice ne se développe. L'extrait est ajouté, en général 5 µl, mesurés avec une micropipette et déposés sur une fine spatule en plastique servant d'agitateur. L'addition de 0,5 ml du mélange ATP + AMP déclenche la réaction enzymatique.

Nous constatons la parfaite linéarité de la réaction enzymatique pendant au moins 5 minutes (photographie 20 de la planche hors texte VI).

3) Activité arginine kinasique

a) principe

L'activité arginine kinasique est étudiée suivant la réaction directe :



La méthode que nous employons dérive de la technique de WIESMAN et RICHTERICH préalablement signalée (Cf. p.102). A la réaction à étudier, sont couplées une réaction auxiliaire et une réaction indicatrice.

L'oxydation du NADH_2 en fonction du temps est mesurée à 334 nm, à + 25° C, dans une cuve de 1 cm.

Cette méthode voisine de celle que nous utilisons pour l'étude de l'adénylate kinase, nous permet d'effectuer de grandes séries d'analyses.

b) appareillage

L'appareillage est le même que celui employé pour l'adénylate kinase.

c) réactifs utilisés

Le tampon, les solutions de KCl et MgCl_2 ainsi que les solutions de coenzymes, enzymes et substrats sont les mêmes que pour l'adénylate kinase, à l'exception de la solution d'AMP qui est remplacée par une solution d'arginine à 172,35 mg dans 15 ml d'eau distillée.

d) mode opératoire

Dans chaque cuve, on place pour chaque réaction enzymatique les mêmes quantités de réactif que pour l'adénylate kinase. Toutefois l'AMP est remplacé par le même volume : 300 μl de solution d'arginine ce qui donne dans un millilitre de tampon 15 μM de L-arginine.

Nous avons apporté des modifications au milieu de WIESMAN en ce qui concerne le pH du tampon et la concentration en ions K^+ ; nous en préciserons l'intérêt plus loin.

L'oxydation du NADH_2 en fonction du temps se traduit sur l'enregistreur par une diminution de la densité optique.

e) expression des résultats

L'unité arginine kinasique est la quantité d'enzyme qui forme 1 μM de ADP par minute, dans les conditions des expériences. Ceci est matérialisé par l'oxydation d'une micromole de NADH_2 par minute à $+ 25^\circ \text{C}$.

L'activité arginine kinasique des extraits est calculée de la même façon que l'activité adénylate kinasique.

f) essais préliminaires

Afin de préciser les meilleures conditions de pH, de concentration en ions K^+ et en arginine dans le milieu réactionnel, nous avons procédé à quelques essais préliminaires en faisant varier ces paramètres.

Pour étudier l'influence du pH, nous avons d'abord opéré avec un extrait de partie transparente de *C. gigas*, en utilisant des tampons tris-HCl 0,1 M à deux pH différents, pH 7,4 que nous avons utilisé pour l'adénylate kinase et le pH 8,6 indiqué par WIESMAN, selon la formule :

tris	6,056 g
HCl 2 N	6,1 ml
eau distillée	q.s.p. 500 ml

Pour la solution d'arginine, nous avons essayé deux concentrations, l'une à 0,5745 mg par réaction, l'autre six fois plus concentrée à 3,3447 mg par réaction, ce qui correspond respectivement à 5 μM et 15 μM d'arginine dans un millilitre de milieu réactionnel.

Pour les solutions de KCl, deux concentrations ont été également envisagées, d'une part, celle utilisée pour l'adénylate kinase, d'autre part, une solution 10 fois plus concentrée, soit 50 μM de KCl par ml, quantité recommandée par WIESMAN.

Le tableau suivant rassemble les activités enzymatiques obtenues en U.I. par mg de protéines.

		pH 7,4	pH 8,6
Arginine 2,5 μ M	KCl 5 μ M	11,0905 10,4759 10,1476	11,6124 11,5018
	KCl 50 μ M	11,6124	11,1823 10,7829
Arginine 15 μ M	KCl 5 μ M	15,2848 14,5505 15,0961	14,0429 14,0550 13,1270
	KCl 50 μ M	13,7237 14,0429	13,0083 12,7125

Les meilleurs résultats sont obtenus avec la solution d'arginine la plus concentrée, comme le recommande WIESMAN et la solution de KCl la moins concentrée correspondant à celle que nous utilisons pour l'adénylate kinase. En outre, le tampon de pH 7,4 semble préférable à celui de pH 8,6 qui donne des chiffres inférieurs.

Dans une deuxième série d'essais toujours avec le même extrait de *C. gigas* en utilisant les solutions d'arginine et de KCl précédemment sélectionnées, nous avons expérimenté des tampons à trois pH différents : 7,4, 8 et 8,6.

Les tampon de pH 8 a pour formule :

tris	6,056 g
HCl 2 N	13,4 ml
eau distillée	q.s.p. 500 ml

Les activités enzymatiques déterminées restent les plus fortes avec le tampon de pH 7,4. En outre, cette valeur est proche de celle du pH physiologique de l'huître (68).

Avec les extraits de partie transparente de *C. angulata* et de partie nacrée des *C. gigas* et *angulata*, nous avons fait les mêmes constatations.

Ces essais nous ont conduits à retenir les mêmes solutions que celles utilisées pour l'adénylate kinase, dans un tampon de pH 7,4 et non 8,6 comme celui de WIESMAN. Nous avons retenu une concentration de KCl dix fois plus faible que celle du milieu de WIESMAN, puisque nous avons trouvé une diminution d'activité avec un excès d'ions K^+ .

La méthode d'OLIVER, réaction inverse à trois constituants, applicable à la créatine kinase, ne semble pas avoir été utilisée par les auteurs pour l'arginine kinase (Cf. p102). En outre, nous n'avons pu l'expérimenter en raison des difficultés rencontrées pour se procurer de l'arginine phosphate convenablement purifié.

g) étude cinétique

Nous avons effectué des séries d'études cinétiques comme pour l'adénylate kinase.

Nous plaçons dans les cuves 1,9 ml de milieu réactionnel sans ATP ni arginine ; le mélange s'équilibre à + 25° C avant d'être passé à l'Eppendorf pour vérifier qu'aucune réaction perturbatrice ne se développe. L'extrait est ajouté, en général 5 μ l mesurés à l'aide d'une micropipette et déposés sur une fine spatule en plastique. L'addition de 0,5 ml du mélange ATP + arginine déclenche la réaction enzymatique.

4) Applications des méthodes à des extraits d'huîtres

Les valeurs moyennes des activités enzymatiques spécifiques que nous avons obtenues en appliquant les techniques précédentes à des extraits de muscle adducteur d'huîtres sont exprimées en unités par milligramme de protéines. Nous les présentons ci-après suivies de l'écart type et du nombre, n, d'expériences effectuées.

Pour l'adénylate kinase :

- huître portugaise

partie transparente :	$1,02 \pm 0,05$	n = 12
partie nacrée :	$3,45 \pm 0,22$	n = 13

- huître japonaise

partie transparente :	$1,24 \pm 0,09$	n = 12
partie nacrée :	$3,92 \pm 0,22$	n = 18

- huître plate

partie transparente :	$1,15 \pm 0,04$	n = 8
partie nacrée :	$2,62 \pm 0,12$	n = 7

L'activité enzymatique spécifique de l'extrait musculaire que nous avons préparé à partir du "*longissimus dorsalis*" du lapin, dans un but comparatif est la suivante :

$7,45 \pm 0,41$	n = 3
-----------------	-------

Pour l'arginine kinase :

- huître portugaise

partie transparente :	$9,7 \pm 0,47$	n = 7
partie nacrée :	$1,7 \pm 0,10$	n = 6

- huître japonaise

partie transparente :	$14,2 \pm 0,46$	n = 11
partie nacrée :	$2,4 \pm 0,11$	n = 6

- huître plate

partie transparente :	$3,32 \pm 0,06$	n = 7
partie nacrée :	$1,19 \pm 0,02$	n = 7

A l'examen de ces résultats, nous pouvons dire, en ce qui concerne les extraits de muscles adducteurs d'huîtres, que l'activité spécifique adénylate kinasique est plus importante dans la partie nacrée que dans la partie transparente, tandis que l'activité spécifique arginine kinasique est plus élevée dans la partie transparente que dans la partie nacrée.

Si l'on compare les résultats obtenus pour chaque genre d'huîtres nous constatons que, pour les *Crassostrea*, la partie nacrée a une activité adénylate kinasique trois fois plus forte que la partie transparente, celle-ci ayant une activité arginine kinasique presque six fois plus importante que celle de la partie nacrée. Pour *Ostrea*, la partie nacrée a une activité adénylate kinasique double seulement de celle de la partie transparente, celle-ci ayant une activité arginine kinasique triple de celle de la partie nacrée. Donc, les activités arginine kinasiques sont plus faibles pour *O. edulis* que pour *C. angulata* et *C. gigas*.

Ces techniques qui ont permis d'apprécier les activités adénylate kinase et arginine kinase des extraits de protéines solubles de muscles adducteurs de trois espèces d'huîtres, seront appliquées aux muscles adducteurs d'autres espèces d'Ostreidae ainsi qu'à d'autres Mollusques Lamellibranches.

En effet, nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'estimation de l'activité adénylate kinasique des muscles adducteurs des Mollusques Lamellibranches. Il nous est donc impossible d'établir des comparaisons.

Pour l'arginine kinase, nous n'avons relevé aucune valeur concernant le muscle adducteur des Ostreidae, par contre, divers auteurs donnent des valeurs concernant le muscle adducteur de *Pecten* et de *Chlamys*.

TONOMURA et Coll. (164), travaillant, en 1955, sur *Pecten yessoensis*, notent que l'activité arginine kinasique de l'homogénat de la partie transparente, rapide, du muscle adducteur, est beaucoup plus importante que celle de la partie nacrée, lente.

VIRDEN et WATTS (169), en 1964, étudiant des extraits musculaires de *Pecten* et *Chlamys*, trouvent les activités arginine kinasiques spécifiques suivantes, exprimées en $\mu\text{M}/\text{minute}/\text{mg}$ de protéine :

Muscle adducteur	Partie transparente rapide	Partie nacrée lente
<i>Pecten maximus</i>	6,7	1,8
<i>Chlamys opercularis</i>	4,1	2,4

On peut noter que nos résultats sont en accord avec les résultats précédemment cités. Il semble que l'activité arginine kinasique spécifique est plus importante dans la partie transparente rapide que dans la partie nacrée lente du muscle adducteur des Lamellibranches. Ceci doit avoir une signification physiologique.

C - LOCALISATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR LES PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES

Les méthodes de détermination des activités enzymatiques que nous avons appliquées aux extraits protéiques des deux parties du muscle adducteur des huîtres, devraient nous permettre de localiser les activités de certaines sous-fractions protéiques sur les profils chromatographiques.

Nous avons fractionné les extraits sur colonne de Sephadex G-100 "fine" suivant le protocole précédemment énoncé (Cf. p. 46)

Le tampon phosphate d'extraction sert au gonflement du gel et à l'élution. L'effluent de la colonne est analysé dans la cellule de l'absorptiomètre en continu, l'enregistrement permettant de suivre le déroulement de la chromatographie.

Les fractions recueillies sur le collecteur sont passées au spectrophotomètre à 280 et 260 nm, ce qui permet de tracer les diagrammes d'élution en portant en ordonnée les densités optiques et en abscisse les volumes recueillis.

Comme nous l'avons exposé précédemment, le coefficient de partage K_{av} est calculé pour chaque pic.

Les figures 50, 51, 52 et 53 ainsi que les photographies 22 et 23 de la planche hors texte VI reproduisent les profils d'élution des pro-

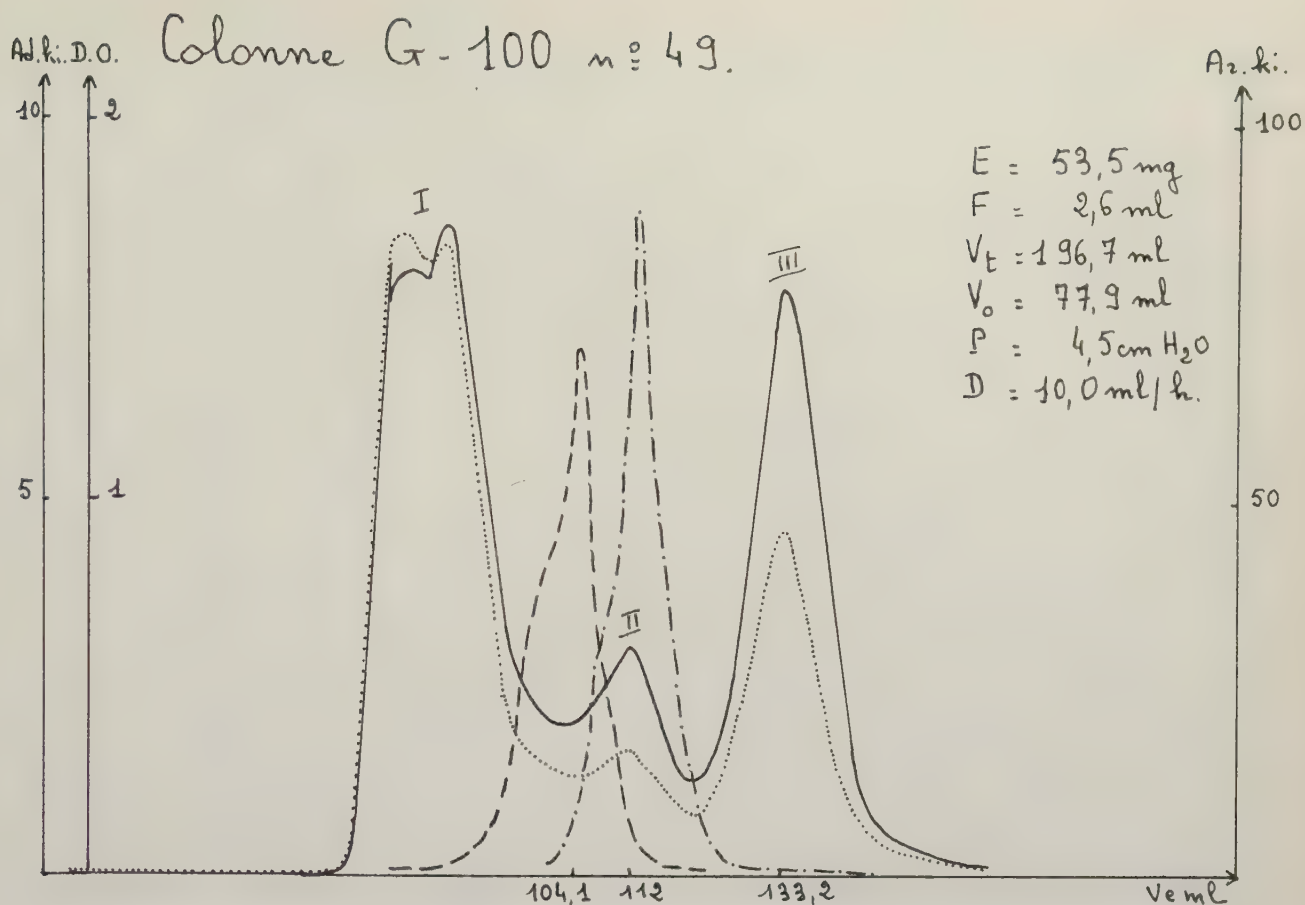
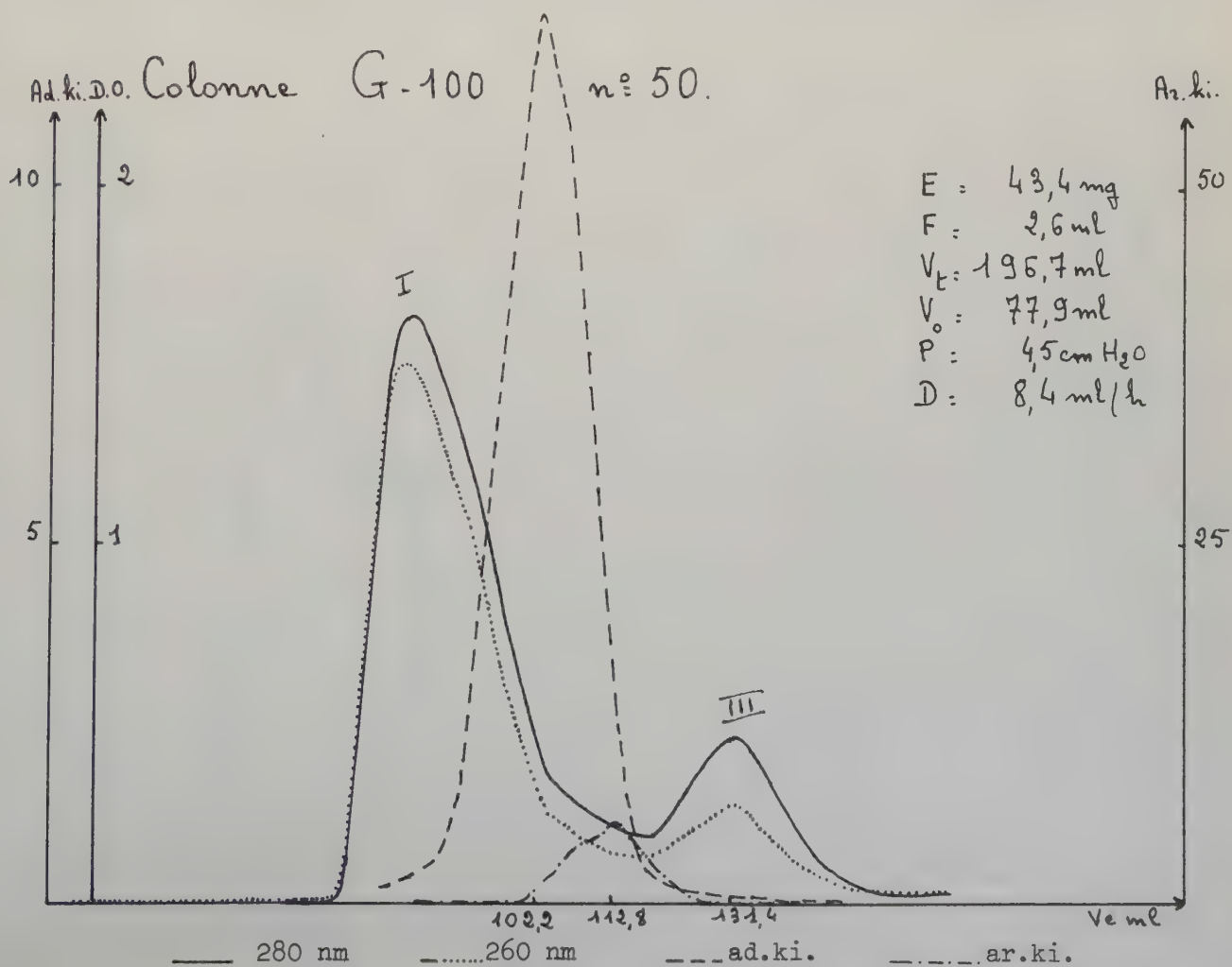


Figure 50 - Profils d'élution d'extract de partie transparente (en haut) et partie nacrée (en bas) du muscle adducteur de *C. angulata*.



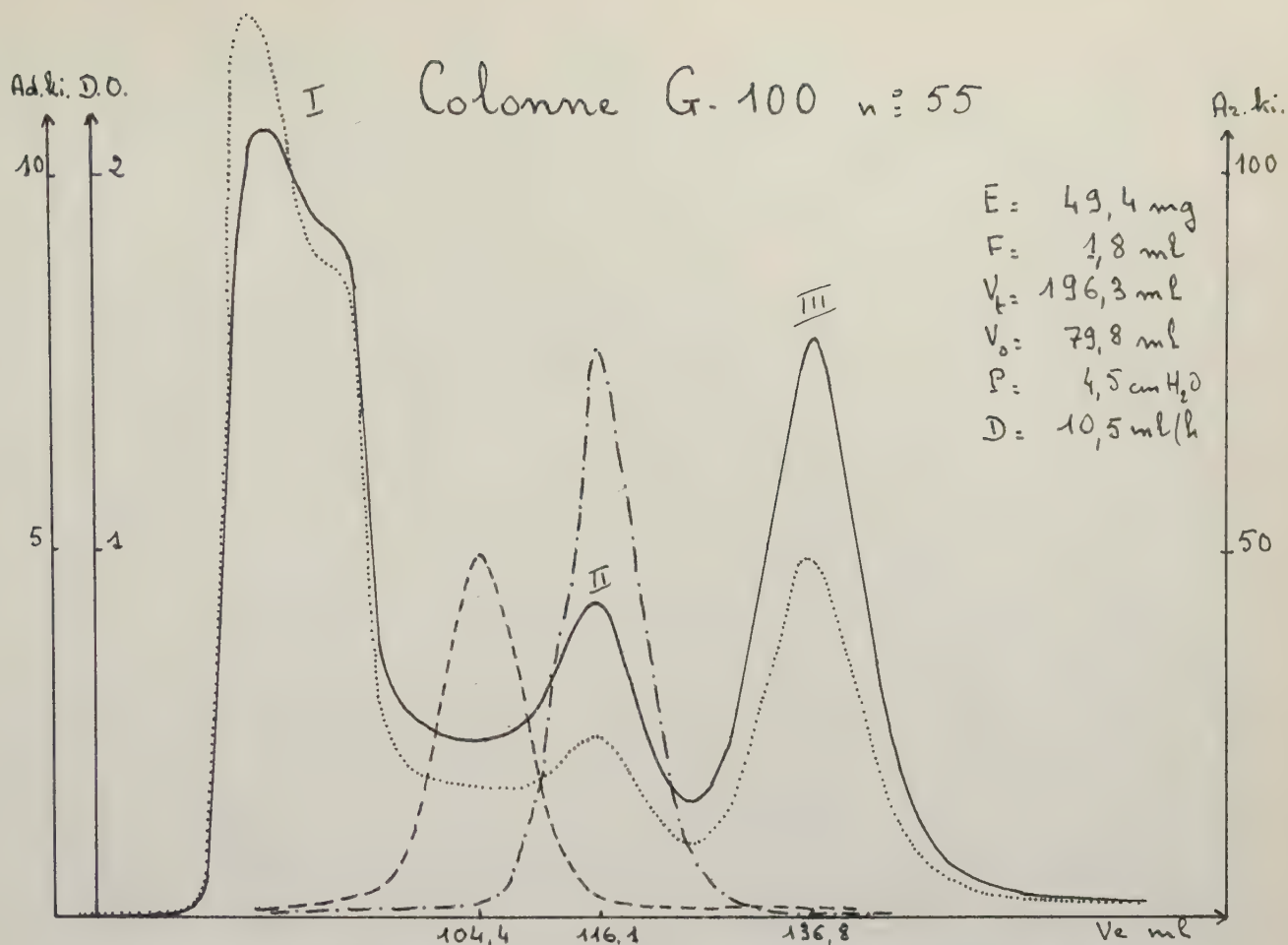
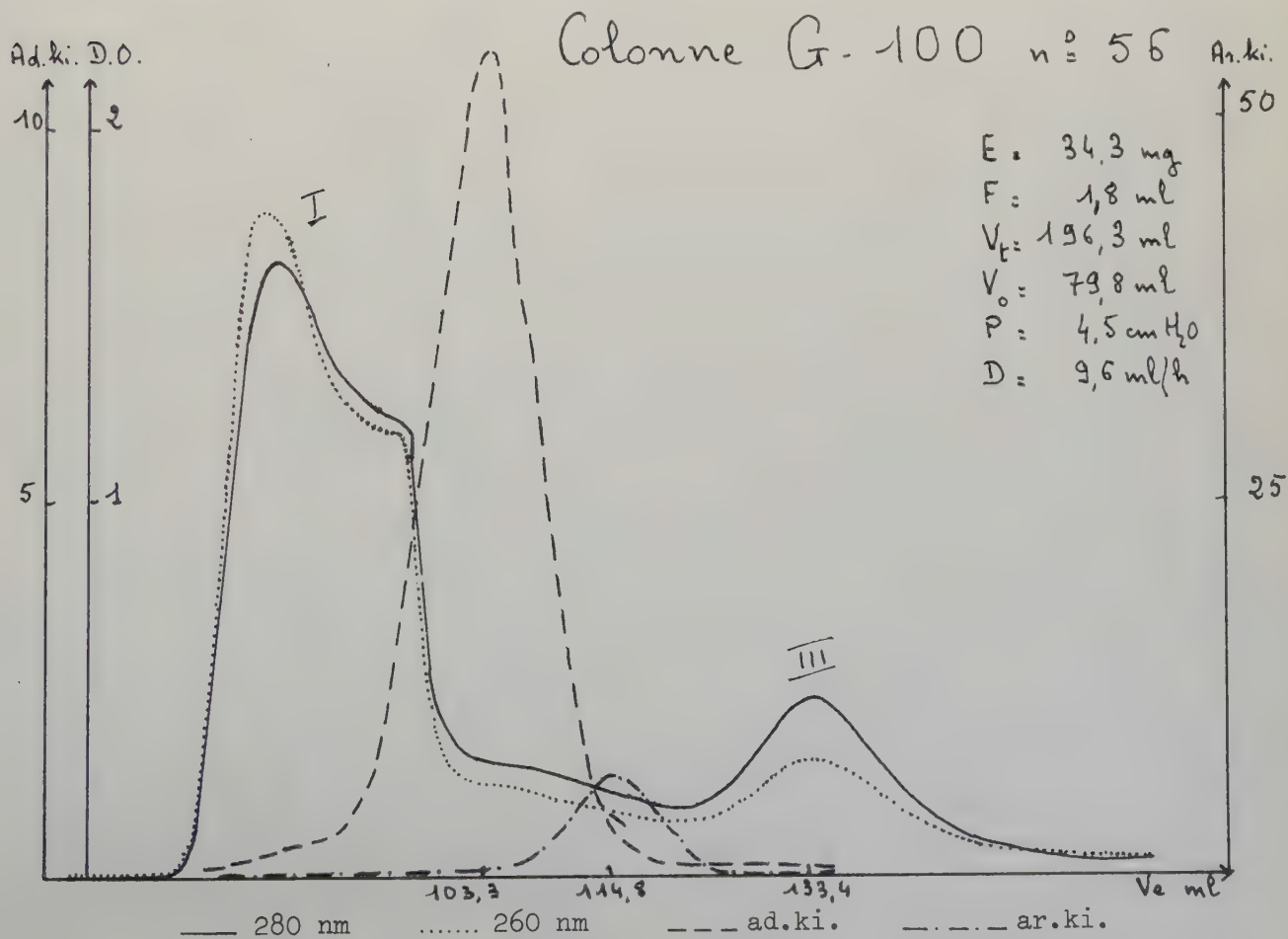


Figure 51 - Profils d'élution d'extrait de partie transparente (en haut) et partie nacrée (en bas) du muscle adducteur de *C. gigas*.



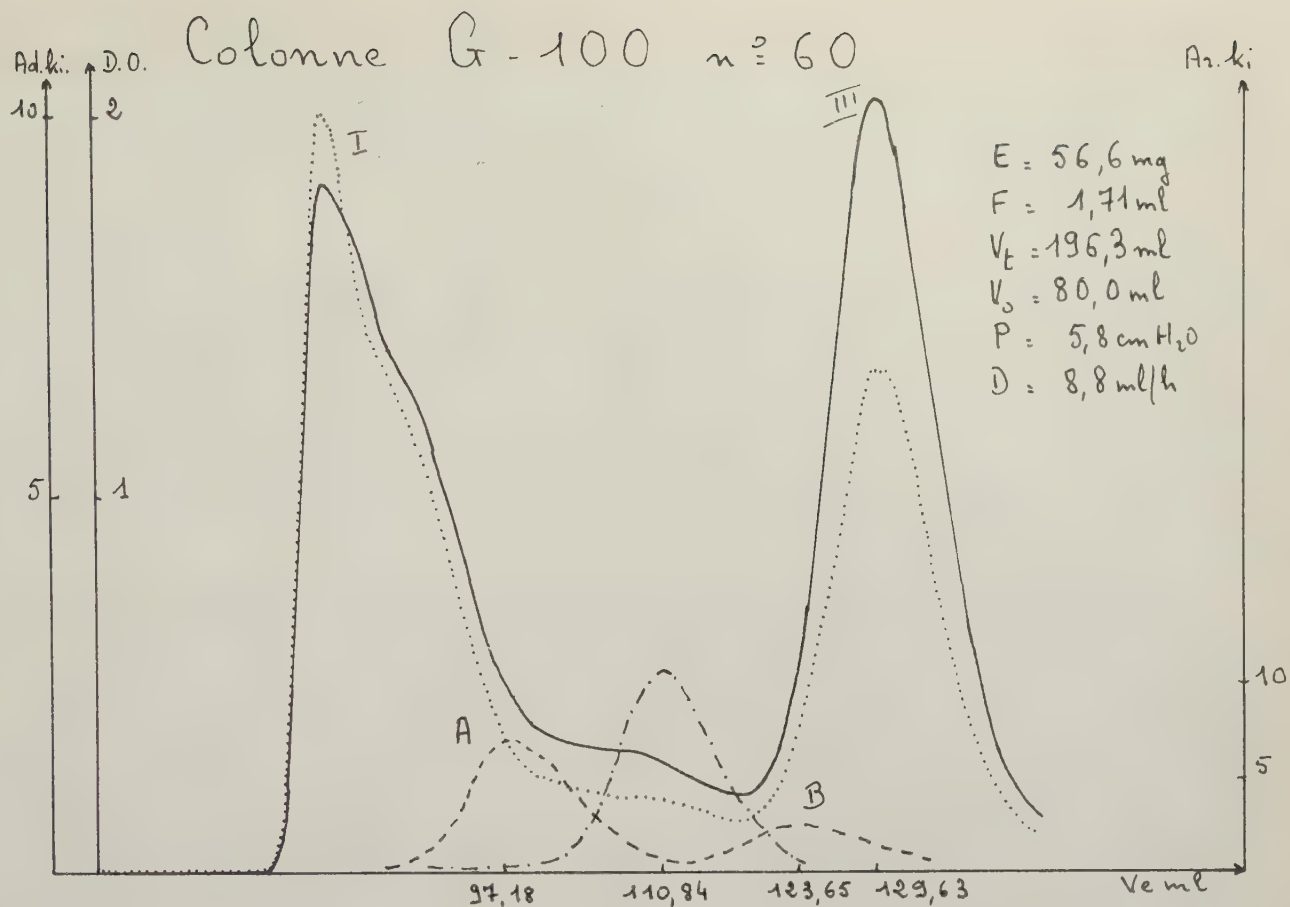
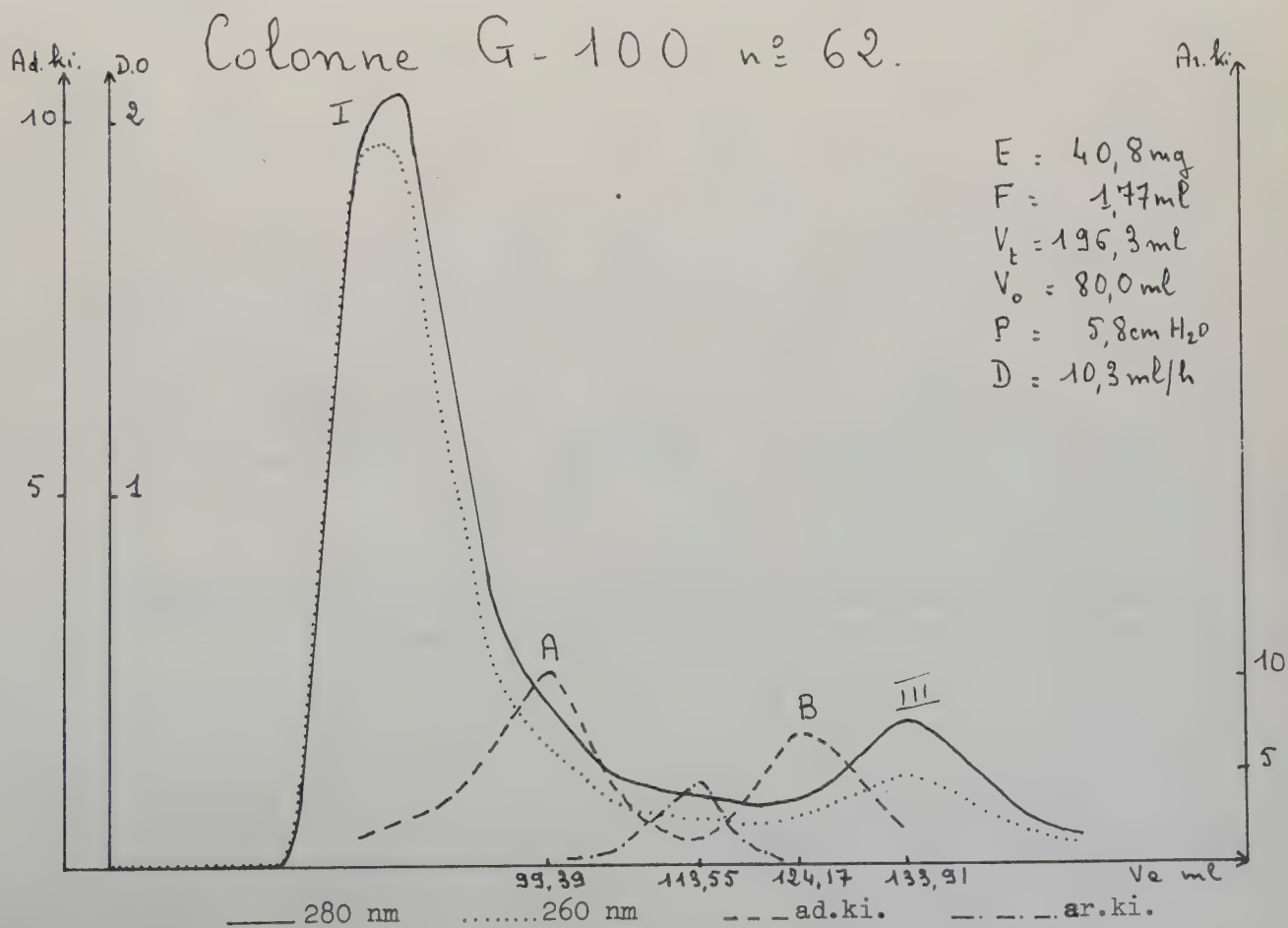


Figure 52 - Profils d'élution d'extrait de partie transparente (en haut) et partie nacrée (en bas) du muscle adducteur de *O. edulis*



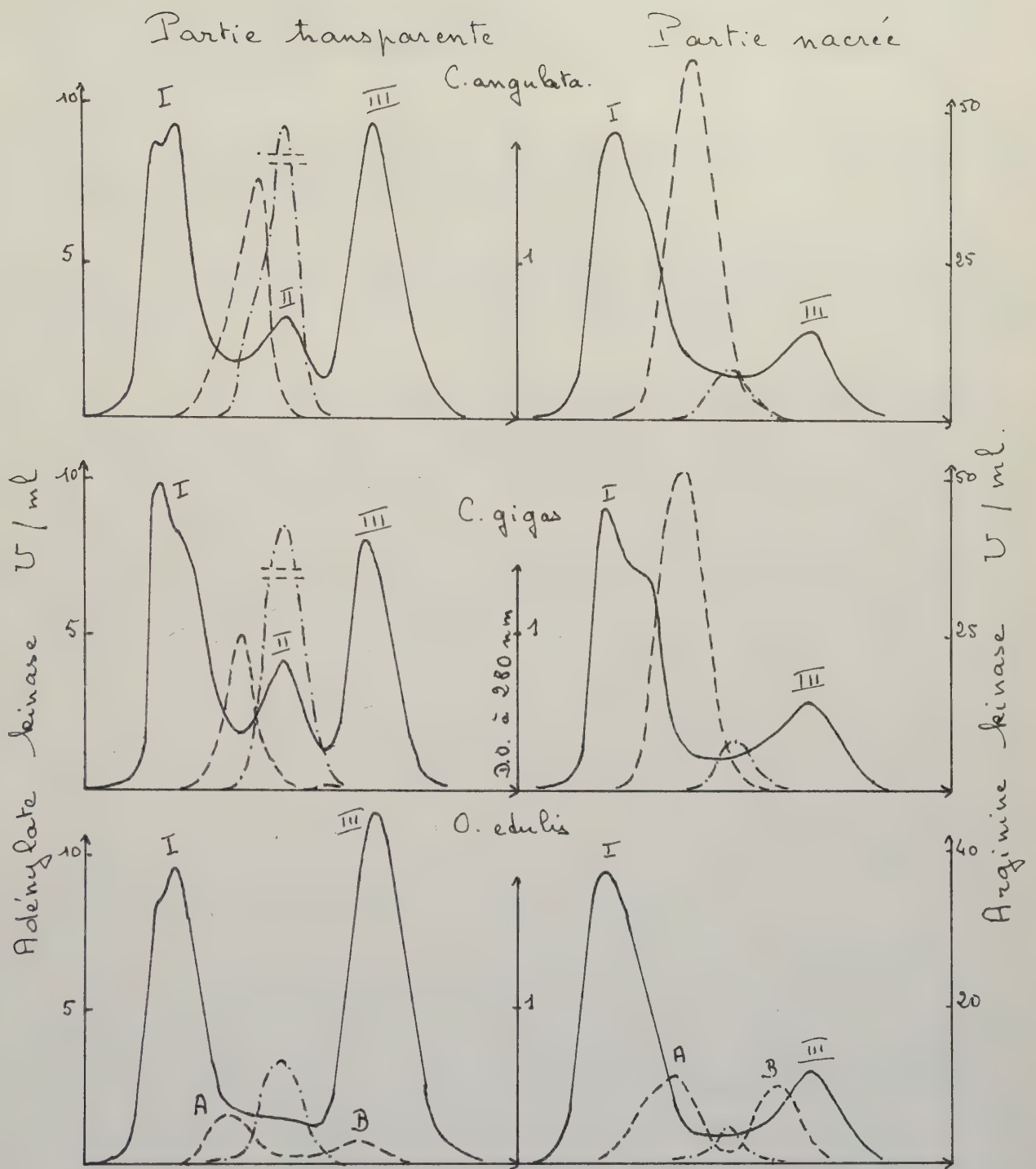


Figure 53 - Comparaison des profils d'élution des protéines solubles sur Sephadex G-100, présentés sur les figures 50, 51 et 52.

téines solubles de plusieurs extraits d'huîtres. Chez les deux *Crassostrea*, *C. angulata* et *C. gigas*, pour la partie transparente, nous retrouvons les trois pics I, II et III ; pour la partie nacrée, le pic II est absent et le pic III moins marqué.

Pour *Ostrea edulis*, il n'y a pas de pic II et le pic III est ici également moins marqué pour la partie nacrée.

L'activité enzymatique déterminée le long des profils est exprimée en unités par millilitre d'éluat. Elle est reportée sur les graphiques des figures.

Chez les *Crassostrea*, l'activité adénylate kinasique présente un maximum pour des fractions protéiques situées entre le pic I et le pic II dans la partie transparente et à droite du pic I dans la partie nacrée, ce maximum étant plus important dans la partie nacrée. L'activité arginine kinasique a un maximum pour des fractions protéiques correspondant au sommet du pic II pour la partie transparente et entre le pic I et le pic III pour la partie nacrée, ce maximum étant plus important dans la partie transparente.

Chez *Ostrea edulis*, l'activité adénylate kinasique se traduit par deux pics A et B, l'un ayant un maximum à droite du pic I et l'autre à gauche mais voisin du pic III dans les parties transparente et nacrée, les maxima étant plus marqués dans la partie nacrée. L'activité arginine kinasique a son maximum situé entre les deux pics de l'adénylate kinase, le maximum est plus élevé dans la partie transparente.

Sur les photographies 22 et 23 de la planche hors-texte VI apparaît à droite un pic IV. Ce n'est pas un pic de protéines, son absorption est beaucoup plus importante à 260 qu'à 280 nm, nous n'en avons pas parlé dans notre thèse, il fait actuellement l'objet d'une étude particulière au Laboratoire.

Nous avons précédemment comparé l'activité spécifique de l'adénylate kinase des extraits de muscles adducteurs d'huîtres, avec celle d'un extrait du muscle *longissimus dorsalis* de lapin.

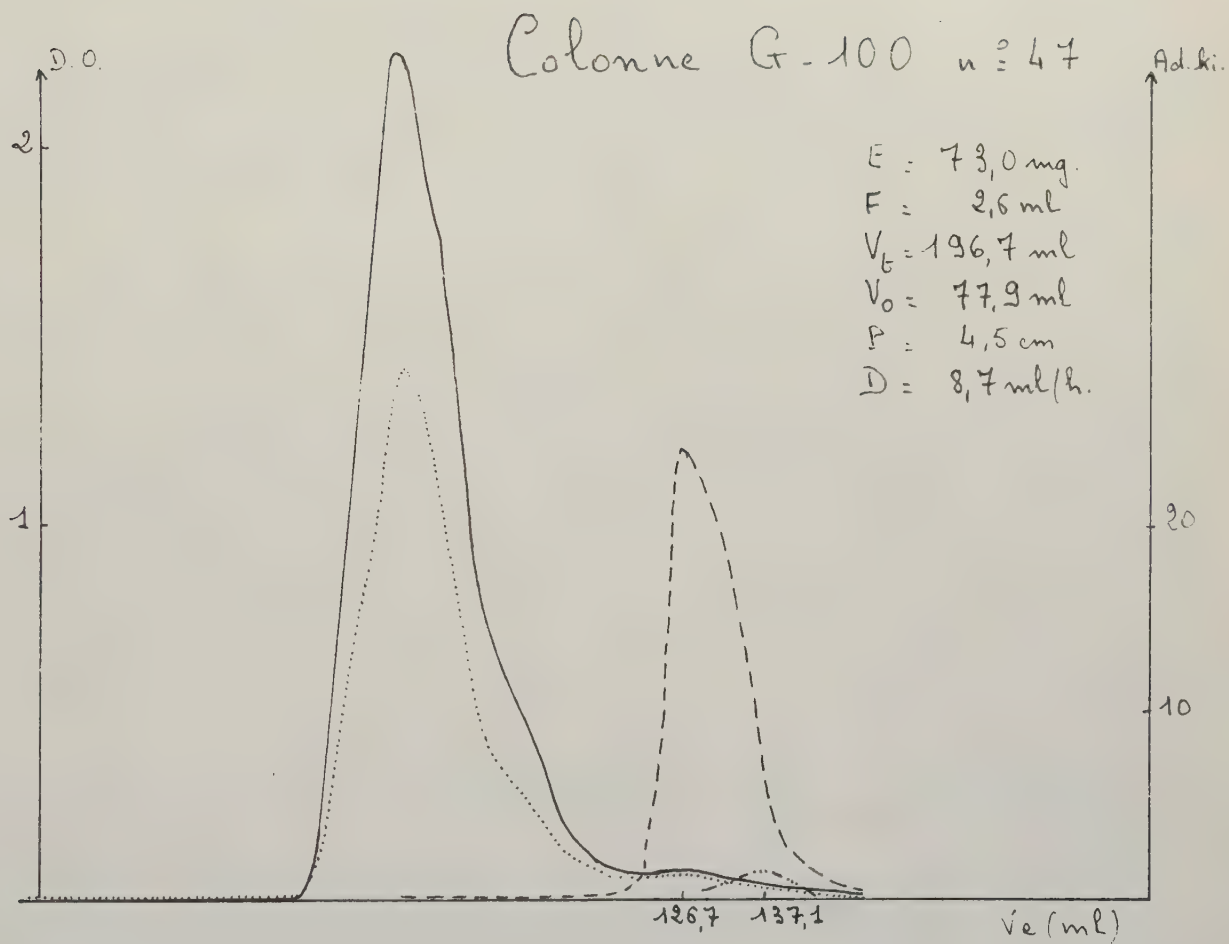


Figure 54 - Profil d'élution des protéines solubles du muscle *longissimus dorsalis* du lapin.

— 280 nm 260 nm
 - - - - Adénylate kinase
 - myoglobine

Nous rapportons ici une étude de fractionnement sur colonne de Sephadex G-100 d'un extrait musculaire de lapin, étude effectuée dans les mêmes conditions que pour les extraits de muscles d'huîtres.

La figure 54 montre le profil d'élution des protéines musculaires du lapin à 260 et 280 nm. Le pic exclu est très important, il est suivi d'un second pic très peu marqué. L'analyse à 407 nm fait apparaître le pic de la myoglobine.

L'activité adénylate kinasique, recherchée dans l'éluat, présente un maximum pour les fractions correspondant au petit pic décelé à 280 nm ce maximum est situé à droite du pic exclu et à gauche du pic de myoglobine dont le poids moléculaire est de 18 000.

D - ESTIMATION DES POIDS MOLECULAIRES DES DEUX ENZYMES

En vue de comparer les enzymes dont nous avons déterminé l'activité aux enzymes analogues des muscles de Vertébrés ou d'Invertébrés, nous avons procédé à une estimation de leur poids moléculaire. Pour cela, nous avons prélevé la ou les fractions correspondant au sommet du pic d'enzyme que nous avons lyophilisées. Dans un premier temps, nous avons fait une appréciation grossière de poids moléculaire par chromatographie sur couche mince de gel de Sephadex et ensuite une estimation plus fine sur colonne de gel de Sephadex.

Une des plus importantes applications de la chromatographie d'exclusion-diffusion est la détermination des poids moléculaires des protéines.

1) Emploi de la chromatographie sur couche mince

a) étude comparative des migrations : extrait total - fractions enzymatiques

Les fractions lyophilisées provenant des sommets des pics d'enzymes ont été mises en solution dans de l'eau distillée, de manière que les solutions contiennent environ 25 µg de protéines pour 10 µl de solution.

Nous avons fait migrer, sur une plaque de Sephadex, d'une part 5 µl d'extrait de partie transparente d'huître portugaise correspondant à 45 µg de protéines et d'autre part 6 µl de chacune des solutions enzymatiques correspondant à 15 µg de protéines.

Sur la figure 55 représentant le schéma du chromatogramme obtenu, on peut observer que l'extrait de partie transparente présente trois taches 1, 2 et 3. Le pic d'adénylate kinase donne une seule tache qui se situe entre la tache 1 et la tache 2 de l'extrait ; le pic d'arginine kinase donne également une seule tache, au même niveau que la tache 2 de l'extrait. Les positions de ces fractions enzymatiques sont conformes à celles indiquées précédemment.

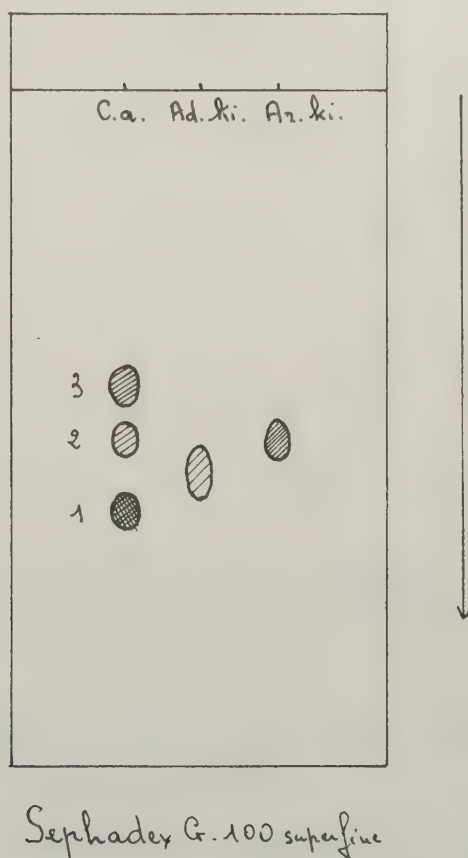
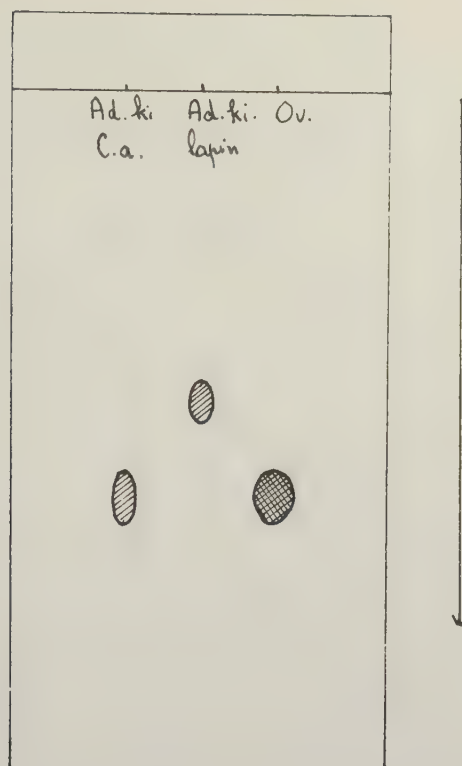


Figure 55 - Chromatogrammes en couche mince d'un extrait de partie transparente du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* (C.a.) et des deux pics enzymatiques : adénylate kinase (Ad.ki.) et arginine kinase (Ar.ki.)

b) étude comparative d'adénylate kinases

Nous avons comparé l'adénylate kinase de *Crassostrea* à deux protéines de poids moléculaires connus : l'adénylate kinase du commerce qui est extraite du muscle de lapin et dont le PM est 21 000 et l'ovalbumine dont le PM est 45 000.

La figure 56 schématise les migrations obtenues. L'adénylate kinase de l'huître ne migre pas comme celle du lapin, par contre, elle migre au même niveau que l'ovalbumine, nous pouvons donc penser que son poids moléculaire est de l'ordre de 45 000.



Sephadex G-100 superfine

Figure 56 - Chromatogrammes en couche mince d'adénylate kinase de *C. angulata* (Ad.ki.-C.a.), d'adénylate kinase de lapin et d'ovalbumine (Ov.)

c) étude comparative des migrations : extrait total - mélange d'enzymes.

Poussant plus avant la comparaison, nous avons fait migrer sur une plaque à côté de l'extrait de partie transparente de *C. angulata*, un mélange à parties égales de deux solutions enzymatiques d'huître (adénylate kinase et arginine kinase) ainsi qu'un mélange des adénylate kinases d'huître et de lapin.

L'adénylate kinase du lapin migre au niveau de la tache 3 de l'extrait tandis que celle de l'huître a migré comme précédemment. Quant au mélange des deux enzymes de l'huître, il donne deux taches occupant les positions indiquées antérieurement.

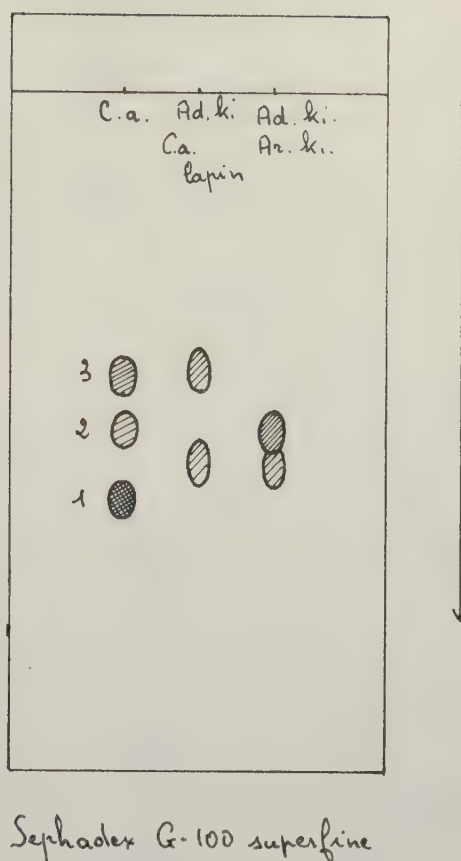


Figure 57 - Chromatogrammes en couche mince d'un extrait de partie transparente du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* (C.a.), du mélange des adénylate kinases d'huîtres et de lapin et du mélange des deux enzymes de l'huître.

L'adénylate kinase du muscle adducteur de l'huître portugaise est donc différente de celle du muscle squelettique d'un vertébré, comme le muscle *longissimus dorsalis* du lapin ; son poids moléculaire doit être environ le double, à en juger par la position de la tache correspondante qui se situe entre les taches 1 et 2.

2) Emploi de la chromatographie sur colonne

Sur colonne de Sephadex G-100, nous avons chromatographié la fraction correspondant au sommet du pic d'enzyme mélangée à des protéines de référence de poids moléculaires connus.

Par élution avec le tampon habituel, on recueille des fractions de 0,9 ml qui sont analysées à 230 et 280 nm et dont l'activité enzymatique est évaluée.

N°	1	2	Ad.Ki.	3	0
Substances et Protéines de référence	Inhibiteur trypsine (soja)	Ovalbumine	Adénylate kinase C.gi./P.T.	Albumine	Bleu dextran
P.M.	21 500	45 000	Poids moléculaire à déterminer	67 000	2.10 ⁶
log.P.M.	4,332	4,653		4,826	subs.exclue
Ve	124,55	105,28	103,87	94,00	78,96
Kav	0,388	0,224	0,212	0,128	0

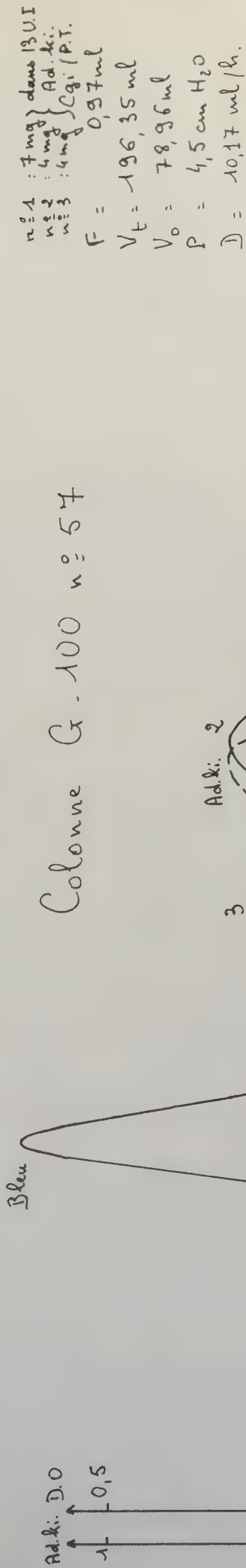


Figure 58 - Profil d'élution obtenu avec le pic d'adénylate kinase - - - de la partie transparente de *C. gigas* et des protéines de poids moléculaires connus.

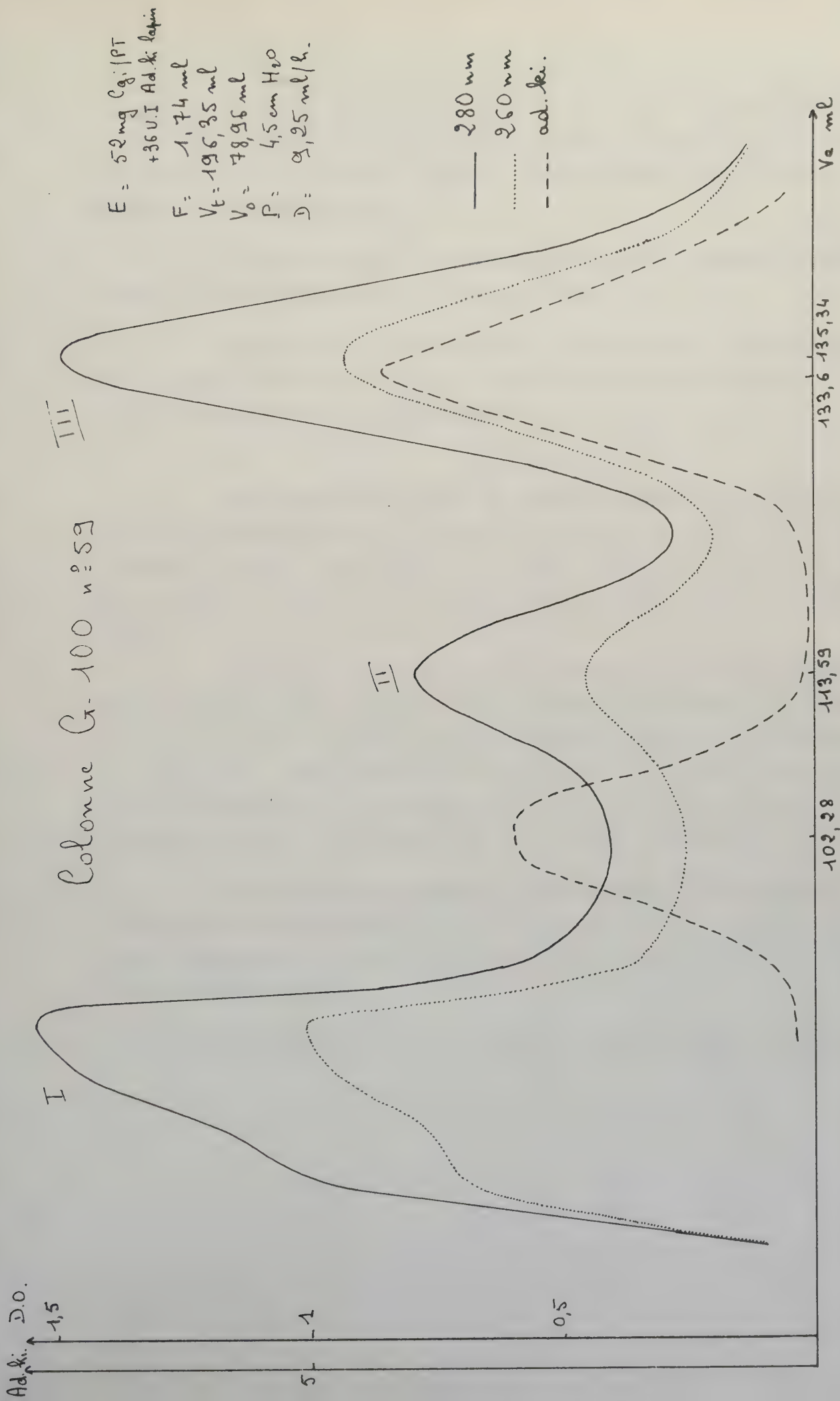


Figure 59 - Profil d'élution d'extrait de partie transparente du muscle adducteur de *C.gigas* additionné de 36 U.I. d'adénylate kinase de lapin.

La figure 58 représente le profil d'élution obtenu avec le pic d'adénylate kinase de la partie transparente de *C. gigas* ayant migré avec du bleu dextran 2 000 et des protéines de référence. Nous avons mesuré les densités optiques à 280 nm et estimé l'activité enzymatique de l'éluat pour localiser l'adénylate kinase.

La calcul de K_{av} , pour les différents pics, permet de tracer la courbe de standardisation $K_{av} = K_{log} P.M. (50)$.

La courbe de standardisation, représentée sur la photographie 21 de la planche hors-texte VI permet d'attribuer une valeur voisine de 47 000 à l'adénylate kinase de l'huître japonaise.

Pour compléter et vérifier cette expérience, nous avons fait une nouvelle chromatographie sur colonne de Sephadex d'une solution de 10 ml d'extrait de partie transparente de *C. gigas* auquel nous avons ajouté 50 μ l de suspension d'adénylate kinase Boehringer de muscle de lapin, correspondant à 36 U.I.

La figure 59 indique le profil d'élution obtenu, les protéines sont analysées à 260 et 280 nm et les activités enzymatiques sont déterminées le long du profil. On trouve deux pics d'adénylate kinase, l'un correspondant à l'enzyme de *C. gigas* entre le pic I et le pic II ; l'autre, dont le maximum se confond presque avec le sommet du pic III, représente l'adénylate kinase du muscle du lapin ; celle-ci a donc bien un poids moléculaire voisin de 20 000.

Pour préciser la valeur de cette méthode de chromatographie sur colonne, nous avons calculé les K_{av} des pics protéiques et des pics enzymatiques des extraits de trois espèces d'huîtres. Les résultats sont réunis dans le tableau suivant :

		Adénylate kinase *	Pic II	Arginine kinase	Ad.Kin. B	Pic III
huître portugaise	P.T.	0,220	0,287	0,287		0,466
	P.N.	0,205		0,294		0,450
huître japonaise	P.T.	0,211 0,199	0,311 0,295	0,311		0,489 0,480
	P.N.	0,202		0,300		0,459
huître plate	P.T.	0,164 0,168		0,293 0,289	0,382 0,403	0,460 0,464
	P.N.	0,178		0,299	0,390	0,474

* Pour l'huître plate, il s'agit de l'adénylate kinase A

Les Kav de l'adénylate kinase des huîtres portugaise et japonaise et l'adénylate A de l'huître plate, sont sensiblement identiques pour les deux parties du muscle adducteur et sont inférieurs à ceux du pic II pour les *Crassostrea*. Le poids moléculaire de cette enzyme est donc supérieur à 40 000 ; nous avons établi la valeur de 47 000 pour la partie transparente de l'huître japonaise. Cette valeur est proche de celle, récemment trouvée par ANDO et NODA pour un Mollusque céphalopode *Loligo pealeii* (4).

Les Kav de l'adénylate kinase B de l'huître plate restent inférieurs aux Kav du pic III, ce qui permet d'estimer que le poids moléculaire de cette enzyme est un peu supérieur à 20 000. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons trouvé un poids moléculaire de l'ordre de 20 000 pour l'adénylate kinase de muscle de lapin, ce qui est en accord avec la valeur de 21 600 avancée par CALLAGHAN (19).

Pour les trois espèces, les valeurs des Kav de l'arginine kinase sont très voisines entre elles. Elles sont identiques à celles du pic II des parties transparentes des *Crassostrea*. En conséquence, le poids moléculaire de l'arginine kinase de ces huîtres est de l'ordre de 40 000. P.MORE a en effet évalué à 40 000 le poids moléculaire des fractions correspondant au pic II.

Pour les parties nacrées, les Kav des pics d'arginine kinase sont à peu près identiques entre eux et à ceux des parties transparentes. Mais, la comparaison directe de ces pics avec ceux des pics protéiques n'est pas possible, le pic II n'existant pas.

En ce qui concerne l'arginine kinase des deux tissus musculaires des huîtres étudiées, son poids moléculaire voisin de 40 000, correspond à ceux compris entre 37 000 et 43 000 avancés par les auteurs qui ont étudié par des méthodes diverses, l'arginine kinase de crustacés et de mollusques (46)(159)(171)(110), ainsi que nous l'avons énoncé au début de cette partie.

Dans le muscle adducteur de divers Lamellibranches, MORELAND et WATTS (111) ont signalé la présence de deux arginine kinases, l'une de poids moléculaire 40 000 et l'autre de poids moléculaire 80 000. Si nous avons mis en évidence deux adénylate kinases différentes chez l'huître plate, par contre, nous n'avons pas rencontré, chez les trois espèces d'huîtres étudiées, les deux arginine kinases signalées par MORELAND et WATTS.

CONCLUSION

Après avoir exposé et discuté les méthodes employées au Laboratoire depuis quelques années et celles, adaptées récemment à une étude plus approfondie des protéines solubles, nous les avons appliquées à des extraits de muscle adducteur de plusieurs espèces de Mollusques Lamellibranches.

En analysant les résultats obtenus, nous avons précisé pour chacune d'elles, l'intérêt qu'elle peut offrir dans le développement des travaux de Biologie que nous poursuivons sur ces espèces.

Les méthodes chromatographiques d'exclusion-diffusion en couche mince ou en colonne de gel de Sephadex, employées par P. MORE, ont été utilisées comme méthodes de base, pour apprécier l'hétérogénéité des extraits protéiques que nous avons préparés à partir de muscle adducteur d'Ostreidae, de Pectinidae et de Lamellibranches dimyaires.

Dans le cas des Ostreidae, la technique analytique en couche mince a été appliquée à des extraits des deux parties musculaires de cinq espèces d'huîtres appartenant aux genres *Ostrea* et *Crassostrea*. Les extraits de parties nacrées ne peuvent être différenciés les uns des autres. Par contre, pour les parties transparentes, la distinction des deux genres est

facile ; pour *Ostrea*, la tache intermédiaire est absente. En ce qui concerne le genre *Crassostrea*, les chromatogrammes sont très voisins pour l'huître portugaise et pour l'huître japonaise ; l'intensité des taches diffère pour les deux autres *Crassostrea*, une des taches est plus faible : la tache 3 pour l'huître africaine, la tache 2 pour l'huître américaine. On peut remarquer que le muscle adducteur de cette dernière présente deux parties, de dimensions sensiblement identiques, comme chez l'huître plate qui donne des chromatogrammes exempts de la tache 2.

Parmi les Pectinidae, les chromatogrammes des extraits de partie transparente de muscle de pétoncle ont le même nombre de taches que ceux des huîtres, mais la tache intermédiaire 2 est particulièrement intense. Avec l'extrait de partie transparente de muscle de coquille Saint Jacques, on n'obtient pas la tache 3 correspondant aux protéines de migration lente.

Sur le chromatogramme de l'anodonte, Lamellibranche dimyaire, on note l'absence de la tache 2.

Cette méthode analytique a donc un certain intérêt en taxonomie pour différencier les genres et les espèces expérimentés , mais ce n'est qu'une méthode d'approche qui doit être complétée par des analyses plus fines.

Avec la méthode chromatographique en colonne de Sephadex G-100, les profils chromatographiques des protéines solubles des parties transparentes du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* et *C. gigas* présentent trois pics nettement séparés, tandis que pour *Ostrea edulis*, on a seulement deux pics, le pic intermédiaire étant absent. Avec les parties nacrées, les profils sont très proches pour les différentes espèces d'huîtres. Pour la différenciation des espèces, cette méthode n'a pas d'avantage marqué sur la précédente, mais elle offre un intérêt pour le fractionnement préparatif primaire des extraits protéiques.

Les méthodes chromatographiques en couche mince et en colonne sont particulièrement bien adaptées à l'estimation des poids moléculaires, par comparaison à des protéines de poids moléculaires connus.

Nous avons pu vérifier que l'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide, utilisée depuis longtemps au Laboratoire, est extrêmement intéressante pour un fractionnement très poussé des extraits protéiques. Elle est, en outre, importante comme complément de l'électrophorèse préparative pour contrôler ses résultats et s'assurer de la pureté des fractions isolées.

Pour les Ostreidae, les électrophorégrammes d'extraits de parties transparentes sont spécifiques et certaines bandes intenses de la zone rapide sont particulièrement caractéristiques. De grandes différences sont observées entre les deux genres *Ostrea* et *Crassostrea*. Parmi les *Crassostrea*, il existe des analogies entre les huîtres portugaise et japonaise. Mais, avec la portugaise, on a deux fines bandes supplémentaires et, par densitométrie, on décèle des différences quantitatives au niveau des trois bandes caractéristiques. La distinction entre ces deux espèces et les huîtres africaine et américaine apparaît nettement sur les colonnes isolées ; elle est facilitée si l'on fait migrer les extraits deux à deux sur la même colonne de gel.

Pour les parties nacrées des cinq espèces d'huîtres, les migrations sont un peu moins spécifiques mais l'on peut noter des similitudes plus grandes encore entre les huîtres portugaise et japonaise.

Pour les extraits de Pectinidae et de dimyaires, nous avons observé des migrations bien particulières.

L'électrophorèse sur Cellogel RS, méthode nouvelle à pouvoir de résolution légèrement moindre que celle sur gel de polyacrylamide, a un intérêt analytique certain. Sa mise en oeuvre est plus rapide. Les électrophorégrammes comportent moins de bandes mais ils permettent également une identification des espèces.

Les résultats obtenus avec les méthodes chromatographiques et électrophorétiques présentent un grand intérêt pour la taxonomie biochimique des Mollusques Lamellibranches, qui vient compléter la taxonomie classique.

En effet, chez les Ostreidae, par exemple, la différenciation des trois genres, *Pycnodonta*, *Ostrea* et *Crassostrea* est facile, si l'on se base sur les caractères anatomiques, sur les modalités de reproduction et sur des notions écologiques. Mais, l'identification des espèces est très difficile en raison du polymorphisme de la coquille adulte.

C'est ainsi que ROCHEBRUNE affirmait, en 1905, qu'il n'était pas possible de distinguer l'huître africaine de l'huître portugaise (43) et RANSON, plus récemment, se base sur les caractères de la coquille larvaire pour démontrer que les huîtres portugaise et japonaise dérivent d'une seule et même espèce (135)(136)(137). Il pense que ce sont deux races de *Crassostrea angulata*, la race japonaise et la race portugaise (54). Cette hypothèse est renforcée par les travaux de certains auteurs, comme IMAI et SAKAI (66) qui ont constaté que les deux espèces peuvent se croiser pour donner des hybrides féconds.

Les méthodes chromatographiques et surtout électrophorétiques ont souligné la grande ressemblance existant entre ces deux espèces, mais toutefois nous ne pouvons conclure encore à leur identité, en raison de petites différences présentées par les électrophorégrammes.

L'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide est aussi, pour nos travaux, une méthode nouvelle que nous avons adaptée à l'isolement de certaines sous-fractions caractéristiques, à partir de fractions primaires séparées sur colonnes de Sephadex, notamment le pic III des parties transparentes des espèces d'huîtres, pic symétrique, correspondant aux poids moléculaires les plus faibles des extraits protéiques étudiés.

Dans le domaine des méthodes immunologiques, nous avons testé différents systèmes de gels, de tampons et essayé plusieurs méthodes d'immunisation du lapin, que nous avons choisi comme animal d'expérience.

En double diffusion, selon OUCHTERLONY, les arcs de précipitation sont assez différents pour les diverses espèces d'huîtres, sauf pour deux d'entre elles.

L'immunoélectrophorèse assure une meilleure répartition des fractions protéiques mais on ne peut comparer les extraits que deux à deux. Ces deux méthodes, surtout l'immunoélectrophorèse, sont importantes pour suivre la purification des sous-fractions du pic III que nous tentons d'isoler. Elles ont également un intérêt taxonomique certain.

L'activité de deux enzymes essentielles pour le métabolisme énergétique du muscle, l'adénylate kinase et l'arginine kinase, a été déterminée sur les extraits et les fractions chromatographiques.

Pour l'adénylate kinase des Mollusques Lamellibranches, nous n'avons pas trouvé de publications particulières. L'adaptation des techniques classiques à nos problèmes a nécessité des essais en grandes séries. Nous avons étudié trois espèces d'huîtres (*Crassostrea angulata*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*).

Quelle que soit l'huître étudiée, l'activité adénylate kinasique de la partie transparente est inférieure à celle de la partie nacrée.

Sur les profils chromatographiques, l'activité de cette même enzyme est concentrée en un seul pic pour les parties transparentes et nacrées de *C. angulata* et *C. gigas*, mais pour *O. edulis*, elle se répartit en deux pics distincts tant pour la partie transparente que pour la partie nacrée.

La répartition des protéines le long des profils d'élution étant, en chromatographie d'exclusion-diffusion, fonction de leurs poids moléculaires, il est remarquable de constater que chez *O. edulis*, l'adénylate kinase musculaire existe à l'état actif, sous deux tailles dans nos conditions expérimentales.

Le poids moléculaire de l'adénylate kinase des parties transparentes et nacrées de *C. angulata* et *C. gigas* est voisin de 47 000, résultat proche de celui trouvé par ANDO et NODA pour un autre Mollusque. Cette valeur est très supérieure à celle de l'enzyme du muscle squelettique du lapin que nous avons retrouvée voisine de 20 000.

L'arginine kinase a fait l'objet de nombreuses études chez les Mollusques. En ce qui concerne les huîtres, seule l'huître plate a été citée (168). Nous avons dû adapter les méthodes de mesure de son activité, et nous rapprocher du milieu réactionnel utilisé pour l'adénylate kinase. Les résultats sont satisfaisants et comparables à ceux cités dans les quelques références bibliographiques relatives à des Mollusques Lamellibranches.

Nous avons remarqué que, quelle que soit l'huître étudiée, l'activité arginine kinasique de la partie transparente est supérieure à celle de la partie nacrée.

Sur les profils chromatographiques, l'activité arginine kinasique est concentrée en un seul pic pour les parties transparentes et nacrées des trois espèces d'huîtres étudiées.

Le poids moléculaire de cette enzyme est voisin de 40 000, ce qui correspond aux résultats avancés par divers auteurs pour l'enzyme d'autres Mollusques.

Les analogies observées entre les activités adénylate kinasique et arginine kinasique des extraits et des fractions isolées, confirment le rapprochement signalé entre les deux espèces *Crassostrea angulata* et *C. gigas*. Les différences quantitatives et structurales entre les enzymes d'*Ostrea* et de *Crassostrea* sont très significatives.

La morphologie, la physiologie, et l'écologie d' *O. edulis* sont totalement différentes de celles de *C. angulata* et *C. gigas* et ceci se reflète dans l'équipement enzymatique du muscle.

Les méthodes enzymologiques apportent donc des éléments supplémentaires de différenciation entre deux genres *Crassostrea* et *Ostrea*

Ces méthodes enzymologiques ont également un intérêt sur le plan physiologique. Ainsi, nous avons constaté que l'activité arginine kinasique des protéines solubles de la partie transparente, tissu musculaire pseudo-strié et rapide, est supérieure à celle des protéines de la partie nacrée, tissu musculaire lisse et lent.

Ces résultats s'expliquent si l'on admet avec RUEGG (143) que l'activité ATPasique de la partie transparente de l'huître est près de dix fois supérieure à celle de la partie nacrée, ce qui est en accord avec le fait que le système "arginine phosphate-arginine kinase" est une voie de resynthèse de l'ATP consommé dans la contraction musculaire.

En ce qui concerne l'adénylate kinase qui joue un rôle important dans la contraction musculaire, nous en avons trouvé des quantités notables à côté de l'arginine kinase. Cette présence est normale puisque cette enzyme est capable de suppléer partiellement l'activité de l'arginine kinase pour la resynthèse de l'ATP. Mais dans la partie nacrée, l'activité adénylate kinasique est bien supérieure à celle de l'arginine kinase alors que, pour les tissus musculaires des Vertébrés, muscle blanc rapide et muscle rouge lent, l'activité phosphagène kinasique semble toujours supérieure à l'activité adénylate kinasique (134).

Pour expliquer ces différences, nous pouvons cependant émettre l'hypothèse suivante. L'ADP étant un inhibiteur de l'activité ATPasique musculaire, l'adénylate kinase catalyserait dans la partie nacrée la formation d'ADP, qui, après installation de la contraction tonique : "catch mechanism", inhiberait l'activité ATPasique, condition nécessaire pour expliquer la faible dépense énergétique de ce processus.

Ainsi les méthodes enzymologiques employées, déjà intéressantes sur le plan taxonomique au moins pour distinguer les genres, sont encore plus importantes pour l'interprétation de la physiologie du muscle adducteur notamment du "catch mechanism".

L'ensemble de ces méthodes chromatographiques, électrophorétiques, immunologiques et enzymologiques constitue un faisceau de moyens d'étude des protéines solubles du muscle adducteur de Mollusques Lamellibranches. Nous avons souligné l'importance des résultats obtenus dans les applications envisagées au cours de ce travail et discuté de leur intérêt dans le domaine taxonomique ainsi que dans celui de la physiologie musculaire. Nous pensons même, avec de tels moyens, aborder l'étude de certaines manifestations physiopathologiques intéressant l'homme.

PLANCHE HORS TEXTE I

PLANCHE I

Photographie 1 - Aspect extérieur des 5 espèces d'huîtres étudiées. De gauche à droite, en haut : *Ostrea edulis*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea gigas*, en bas : *Crassostrea gasar* et *Crassostrea virginica*.

Photographie 2 - Huître portugaise de 4 ans à gauche, huître japonaise de 10 mois au centre et huître japonaise de 4 ans à droite.

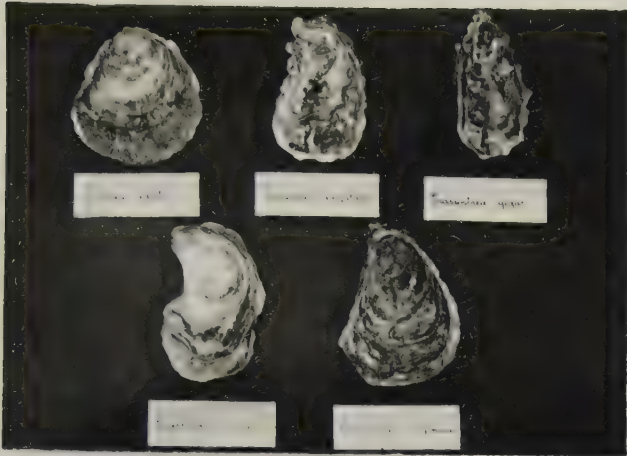
Photographie 3 - Huître plate, *Ostrea edulis*, présentée dans sa valve gauche.

Photographie 4 - Muscle adducteur d'*Ostrea edulis* sur la valve droite, partie nacrée à gauche, partie transparente à droite.

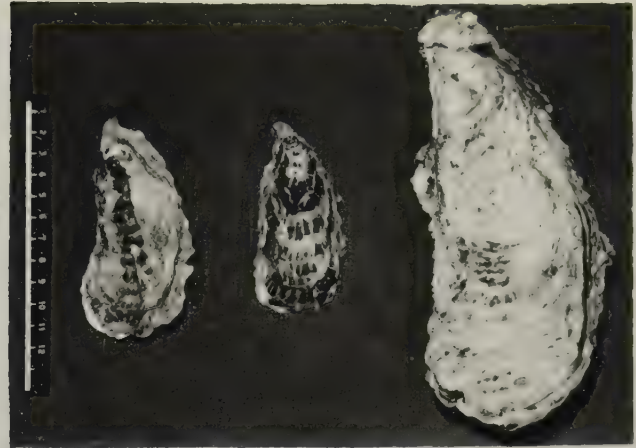
Photographie 5 - Mye, *Mya arenaria*.

Photographie 6 - Mye présentée dans sa valve droite.

PLANCHE I



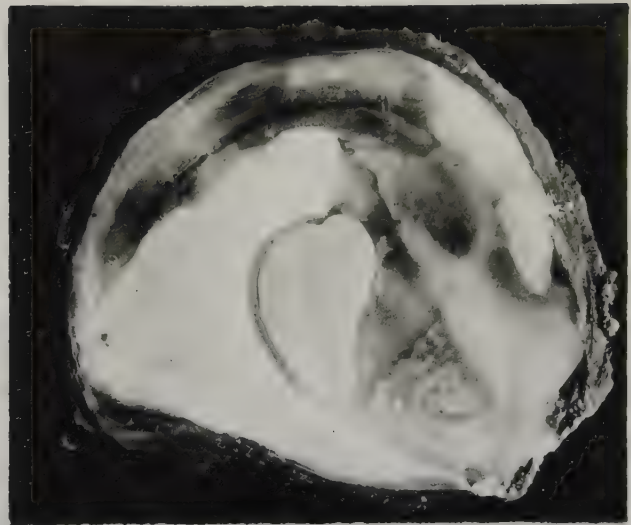
1



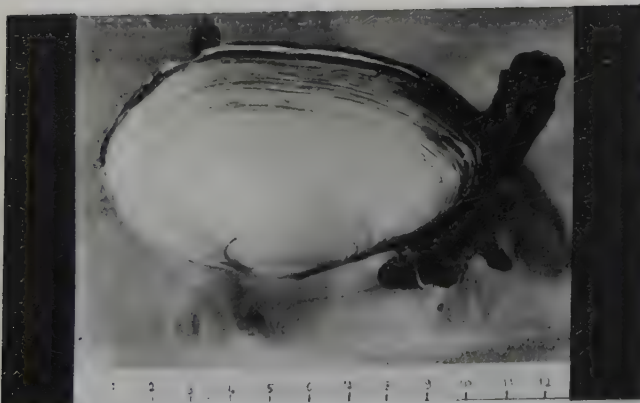
2



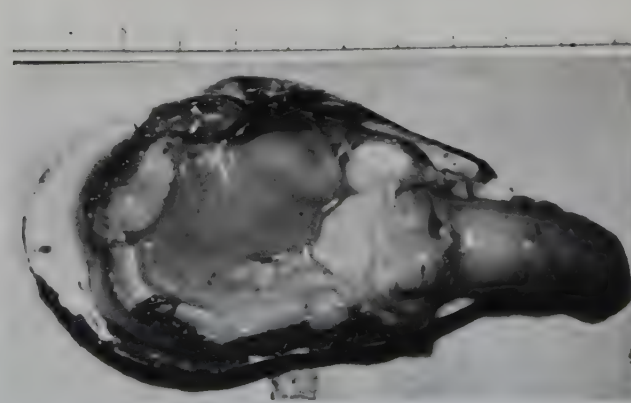
3



4



5



6

PLANCHE HORS TEXTE II

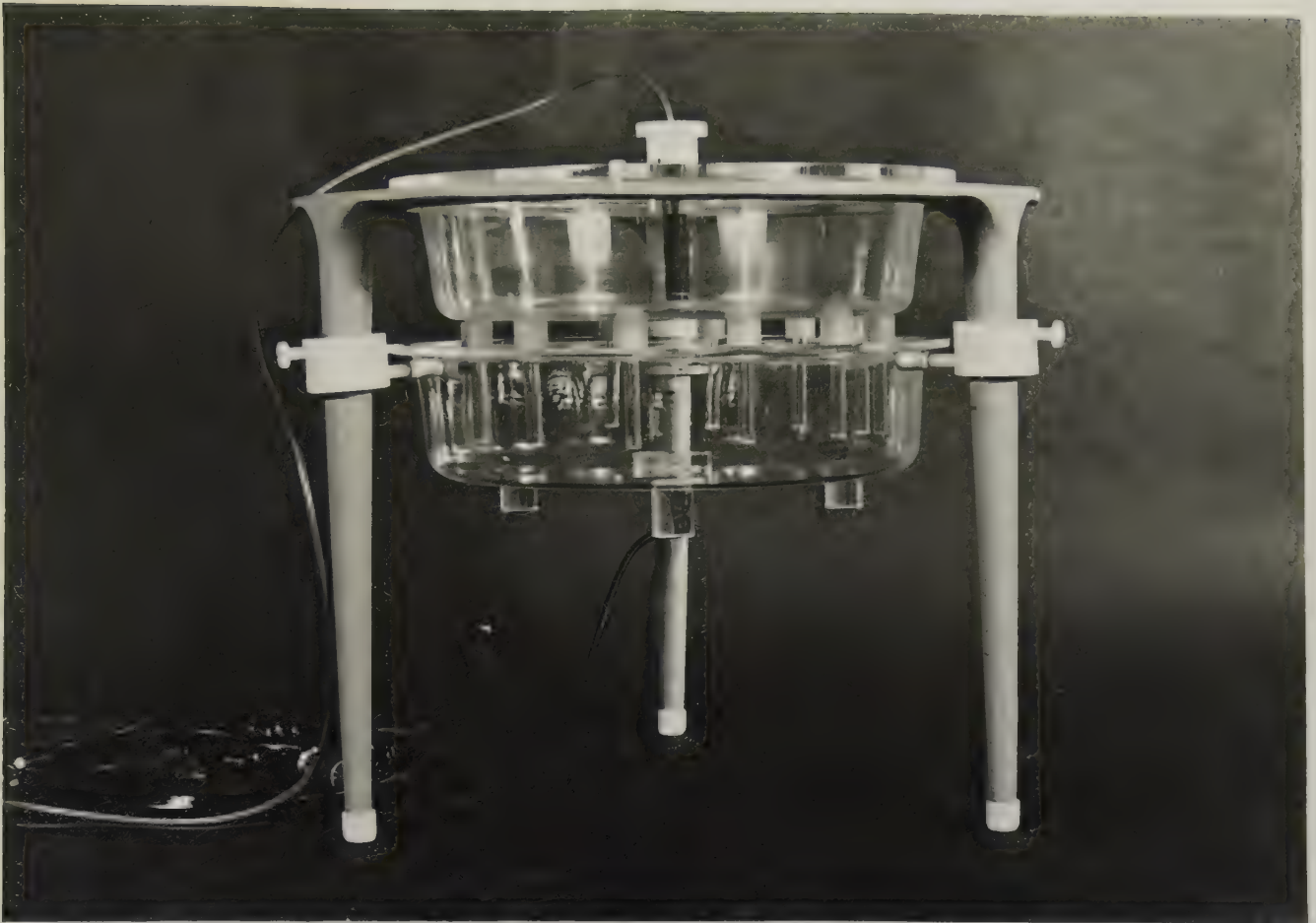
PLANCHE II

Photographie 7 - Cellule d'électrophorèse en gel de polyacrylamide avant modification. Les deux bacs à électrode sont placés sur le trépied, l'un au-dessus de l'autre.

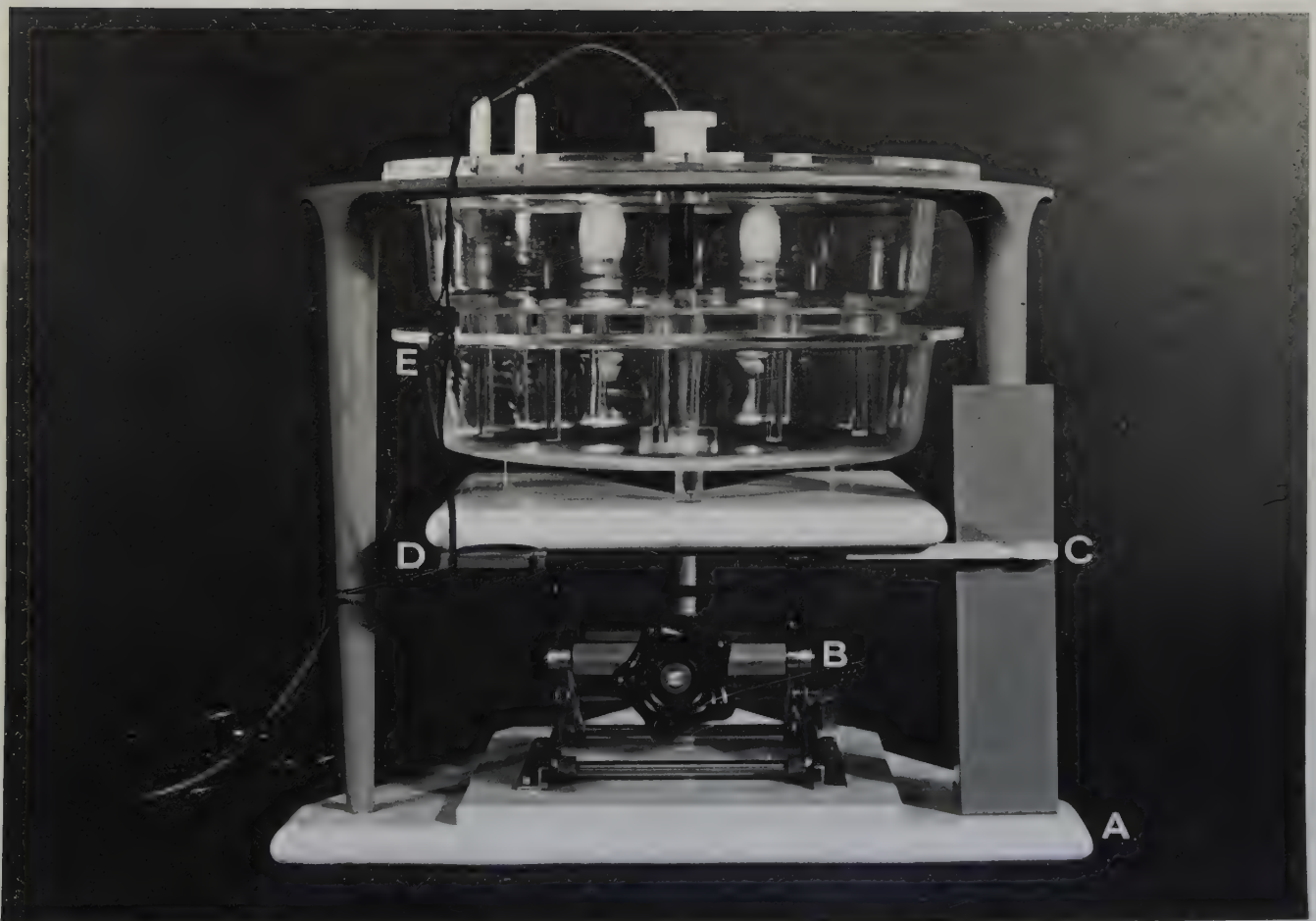


Photographie 8 - Cellule d'électrophorèse après modification

- A. plaque de base
- B. support élévateur de laboratoire
- C. index
- D. plaque échancrée
- E. système de sécurité



7



8

PLANCHE HORS TEXTE III

PLANCHE III

Photographie 9 - Chromatogrammes en couche mince d'extraits de parties transparentes du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* en 5, de *Crassostrea gigas* en 3 et 6, de *Crassostrea gasar* en 4, de *Crassostrea virginica* en 2 et 7 et de *Ostrea edulis* en 8.

Photographie 10 - Chromatogrammes en couche mince d'extraits de parties nacrées du muscle adducteur de *Crassostrea angulata* en 2, de *Crassostrea gigas* en 4 et 7, de *Crassostrea gasar* en 3, de *Crassostrea virginica* en 5 et 8 et de *Ostrea edulis* en 6.

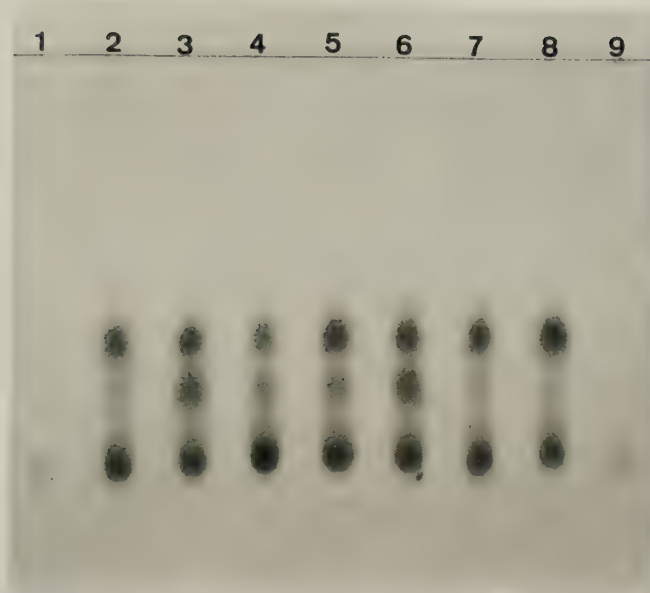
Photographie 11 - Electrophorégrammes en gel de polyacrylamide d'extraits de parties transparentes du muscle adducteur de *Ostrea edulis* en A, *Crassostrea angulata* en B, *Crassostrea gigas* en C, *Crassostrea gasar* en D et *Crassostrea virginica* en E.

Photographie 12 - Electrophorégrammes en gel de polyacrylamide d'extraits de parties transparentes ayant migré deux à deux sur la même colonne de gel.

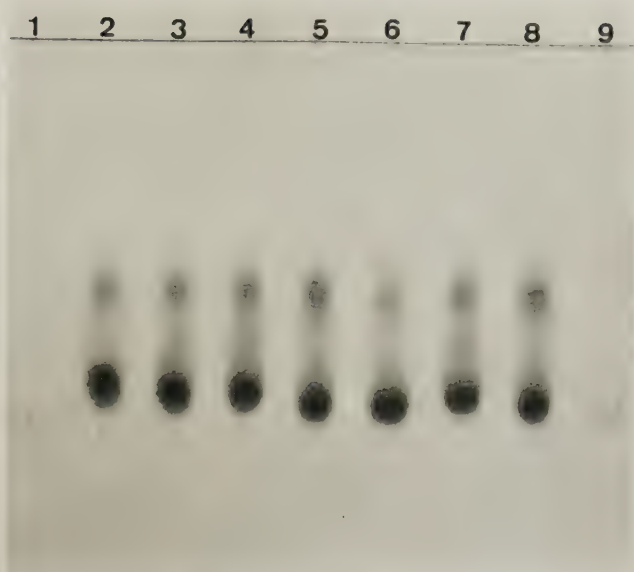
En A : *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*

En B : *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gasar*

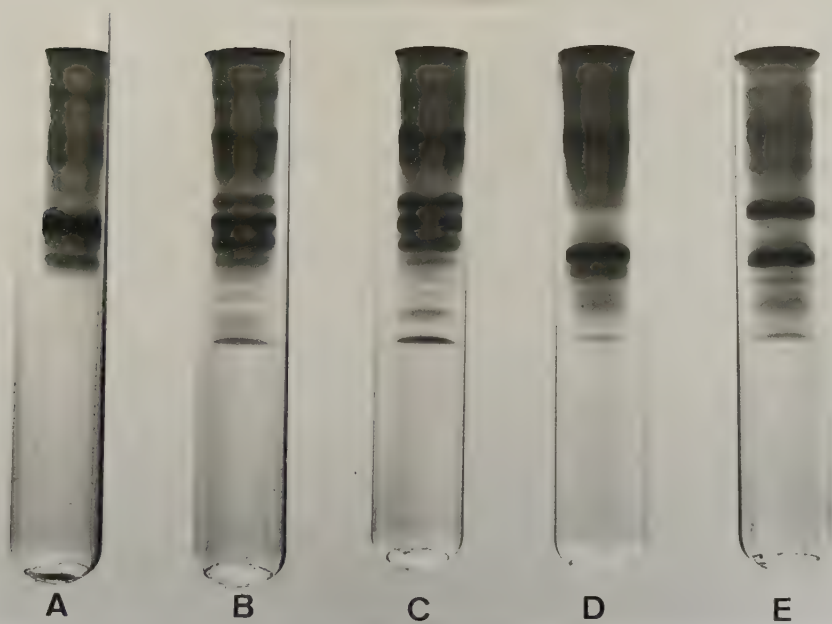
En C : *Crassostrea angulata* et *Crassostrea virginica*.



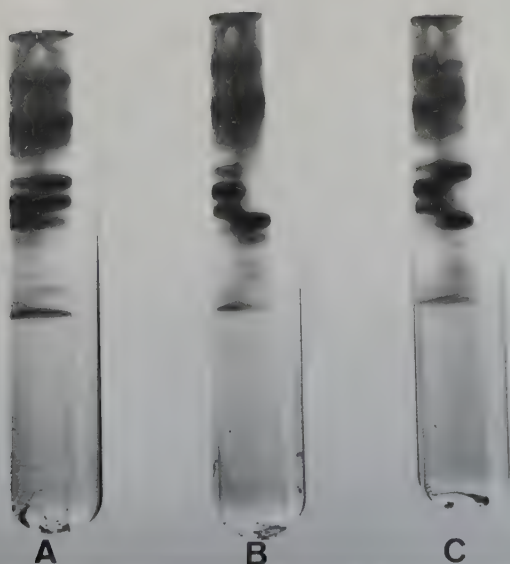
9



10



11



12

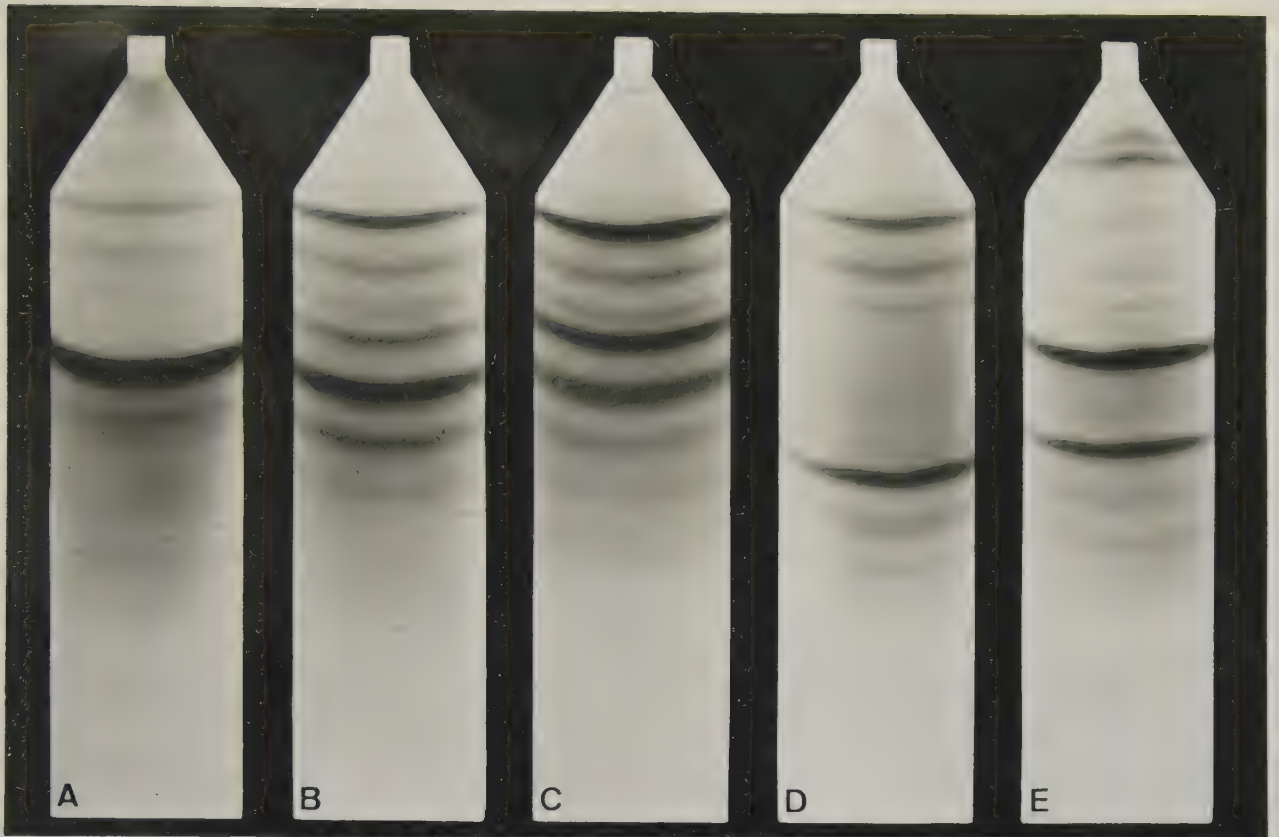
PLANCHE HORS TEXTE IV

PLANCHE IV

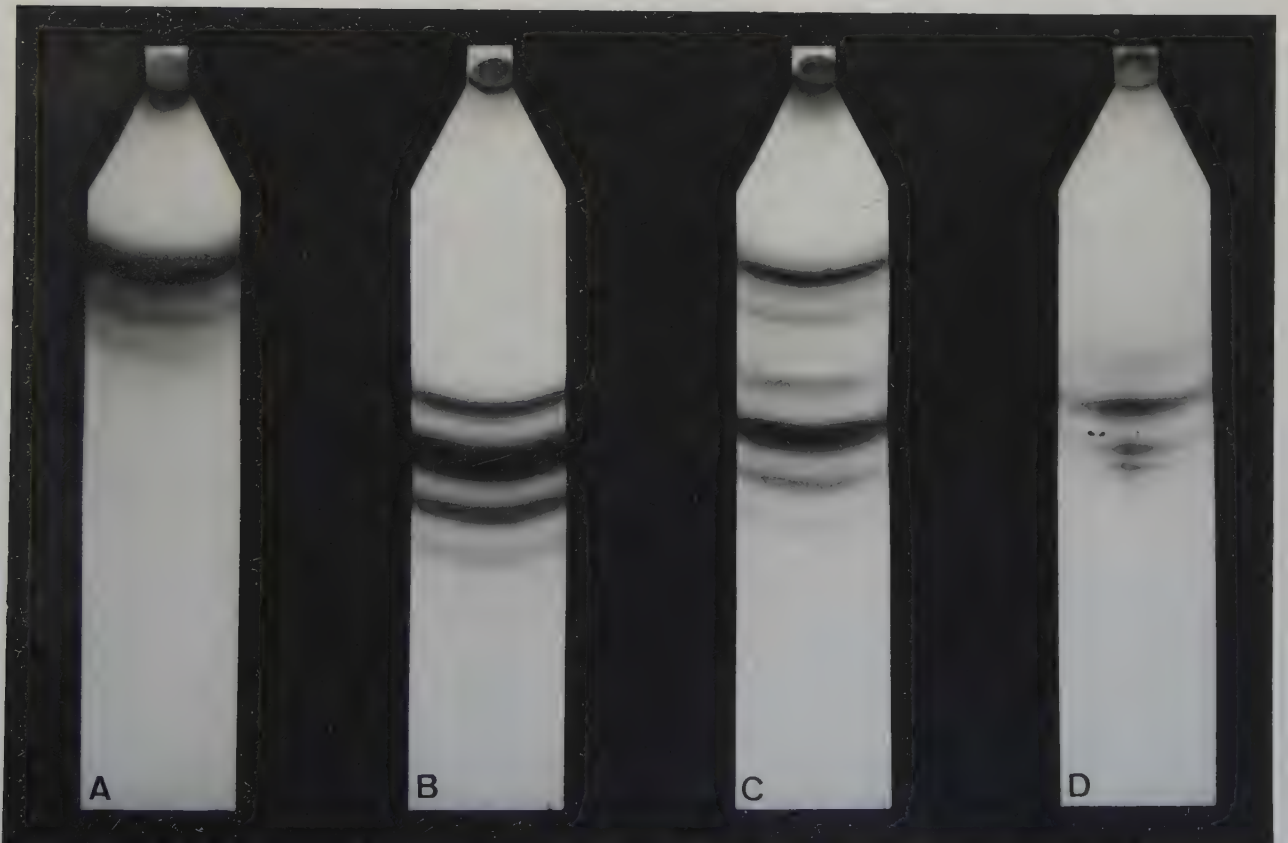
Photographie 13 - Electrophorégrammes sur Cellogel RS d'extraits de parties transparentes du muscle adducteur de *Ostrea edulis* en A, *Crassostrea angulata* en B, *Crassostrea gigas* en C, *Crassostrea gasar* en D, *Crassostrea virginica* en E.

Photographie 14 - Electrophorégrammes sur Cellogel RS des pics protéiques d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata* avant et après dénaturation par la chaleur en milieu acide.

en A : pic II	}	avant dénaturation
en B : pic III		
en C : pics II + III		
en D : pics II + III		après dénaturation



1 3



1 4

PLANCHE HORS TEXTE V

PLANCHE V

Photographie 15 - Immunisation d'un lapin avec 5 puis 10 mg de protéines de la partie transparente du muscle d'huître portugaise.

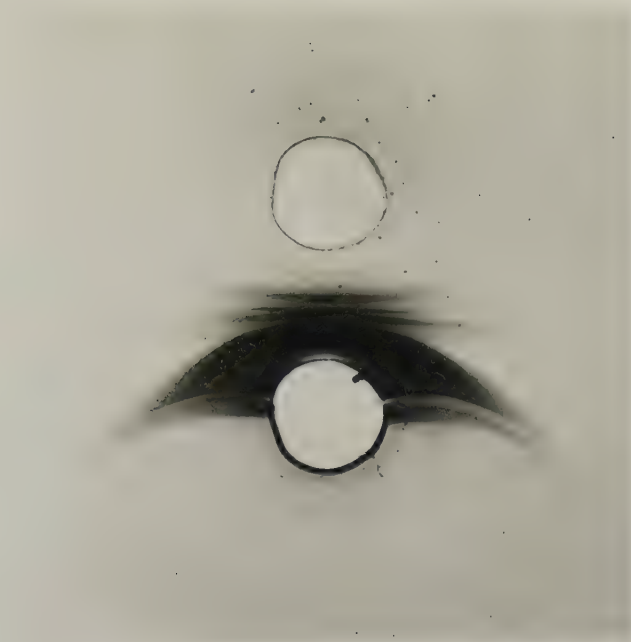
Dans le puits inférieur : immun-sérum prélevé 8 jours après la deuxième piqûre, dans le puits supérieur : extrait correspondant d'huître portugaise.

Photographie 16 - Double diffusion mettant en présence de 25 μ l d'immun-sérum anti-huître portugaise au centre, des quantités variables d'extrait d'huître portugaise dans les puits périphériques.

Photographie 17 - Double diffusion entre les immun-sérums anti-huître portugaise, lyophilisé et concentré à gauche, non lyophilisé à droite, situés dans les puits centraux et les extraits correspondants dans les puits latéraux

Photographie 18 - Double diffusion permettant une comparaison entre les *Crassostrea* étudiés : *Crassostrea angulata* (C.a.), *Crassostrea gigas* (C.gi.), *Crassostrea gasar* (C.ga.), *Crassostrea virginica* (C.v.). Au centre, un immun-sérum anti-*C. angulata*.

Photographie 19 - Immuno-électrophorèse permettant de comparer les extraits de *C. angulata* (C.a.), et *C. gigas* (C.gi.). Au centre un immun-sérum anti-*C. angulata*.



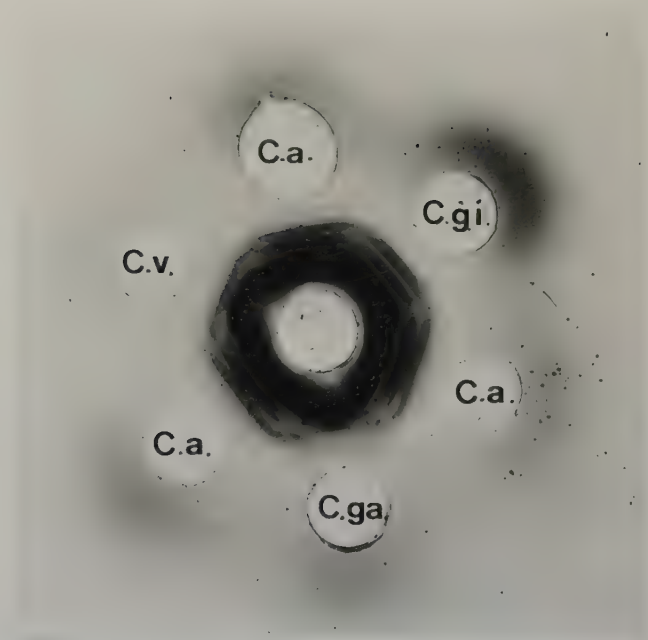
15



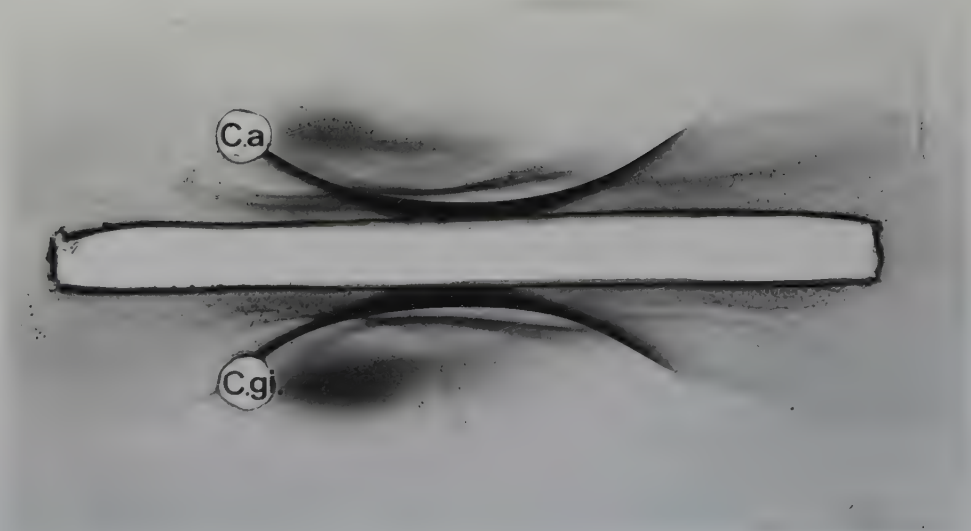
16



17



18



19

PLANCHE HORS TEXTE VI

PLANCHE VI

Photographie 20 - Mesure de l'activité enzymatique (diminution de la D.O. à 334 nm en fonction du temps).

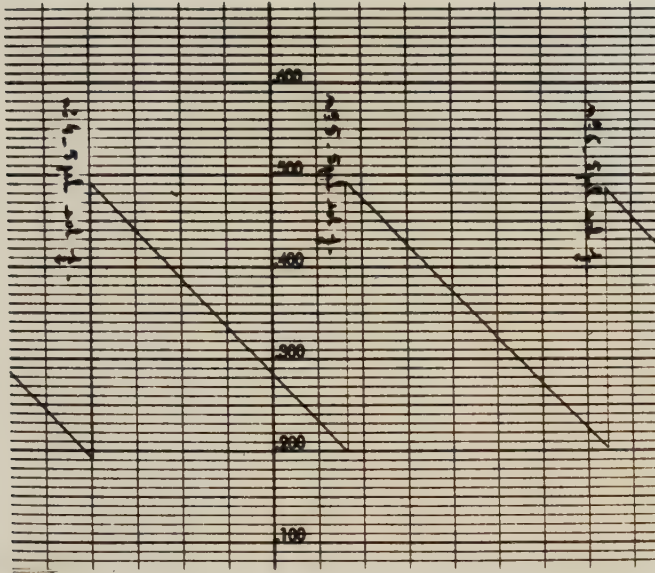
Photographie 21 - Estimation du poids moléculaire de l'adénylate kinase (A.K.) de la partie transparente du muscle adducteur de *C. gigas* (colonne Sephadex G-100 - n° 57 de la figure 58).

Photographie 22 - Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *Crassostrea gigas*.

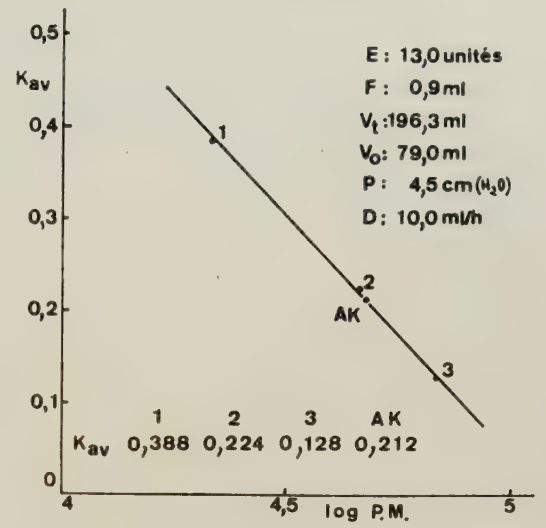
Pics I, II, III et IV décelés à 260 et 280 nm. Activités adénylate kinasique et arginine kinasique.

Photographie 23 - Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *Ostrea edulis*

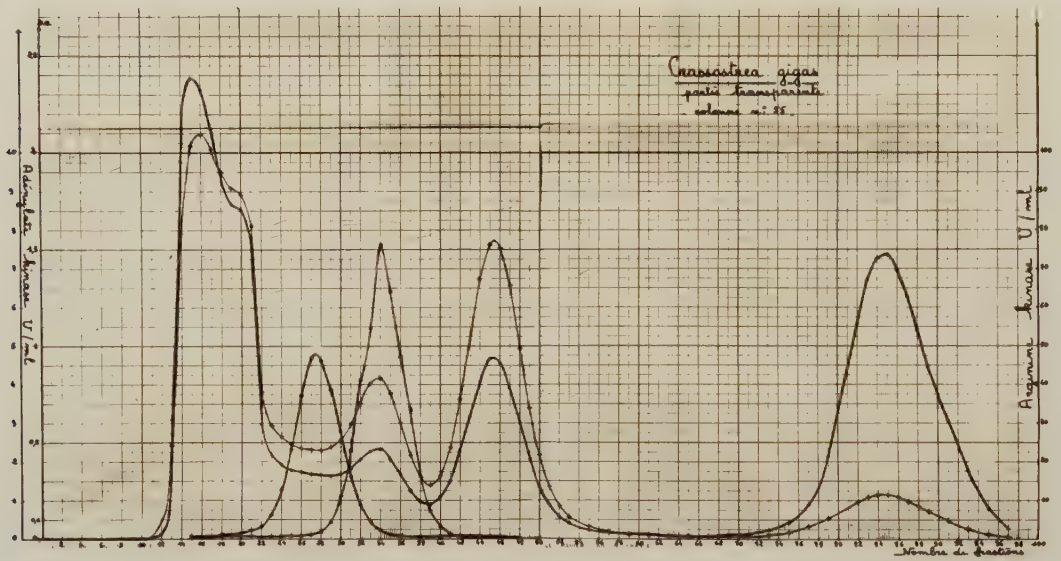
Pics I, III et IV décelés à 260 et 280 nm. Activités adénylate kinasique et arginine kinasique.



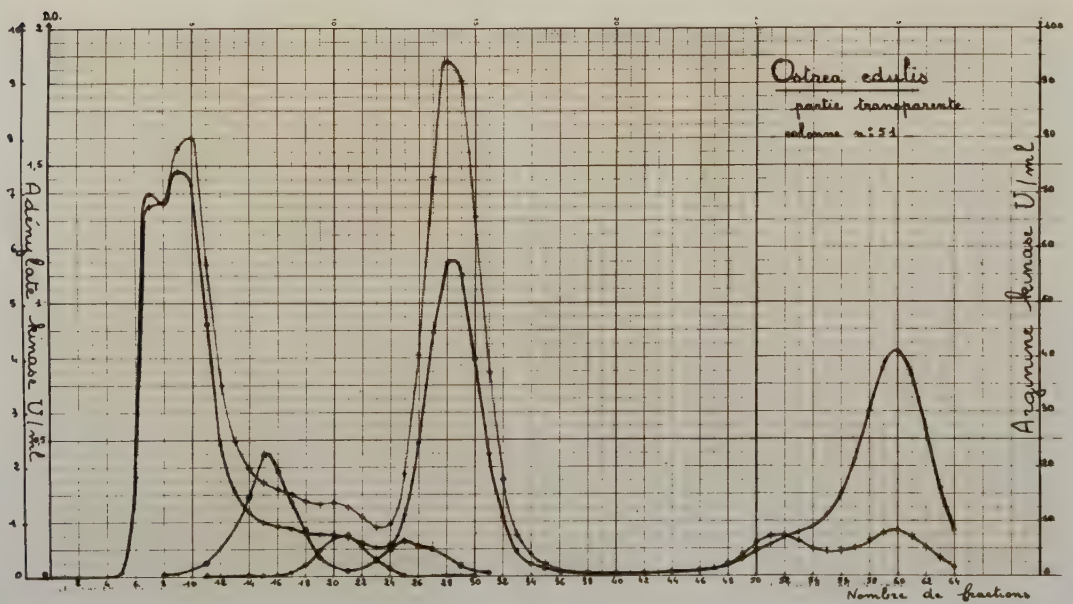
20



21



22



23

B I B L I O G R A P H I E

- B.S. : Bulletin Signalétique du C.N.R.S., B.A. : Biological Abstracts.

1. AAS (K.).- Int. Arch. Allergy, 1969, 36, 152.
2. AAS (K.), JEBSEN (J.W.).- Int. Arch. Allergy, 1967, 32, 1.
3. ADAM (H.).- Biochem. Z., 1961, 335, 25.
4. ANDO (K.), NODA (L.).- Fed. Proceedings, 1971, 30, 1103 Abs.
5. ATKINSON (D.E.).- Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, part I, 85.
6. AVRAMEAS (S.), URIEL (J.).- Nature, 1964, 202, 1005.
7. BAGUET (F.).-Revue des questions scientifiques, 1968, 139, 81.
8. BALDWIN (E.), NEEDHAM (D.M.).- Proceed. Roy. Soc. B., 1937, 122, 197.
(In Physiol. Rev. 1953, 38, 631).
9. BECEMBERG (I.L.de), GAEDE (K.).-Acta. Ci. Venez., 1963-1967, 18,
suppl. n° 3, 84 (In B.S. 29, 12-144417).
10. BLANCHARD (R.).- C.R.Soc. Biol. 1880, 20 Mars (in Arch. Zool. Exptl.
gén. 1909, 2, 295).
11. BLETHEN (S.L.).- Biochem. Genet., 1971, 5, 275 (in B.A., 1971, 52, 19,
107680).
12. BLETHEN (S.L.), KAPLAN (N.O.).- Biochemistry, 1967, 6, 1413.
13. BLETHEN (S.L.), KAPLAN (N.O.).- Biochemistry, 1968, 7, 2123.
14. BOEHRINGER Mannheim France.- Communication personnelle.
15. BOWDEN (J.).- Inter. Rev. Cytol., 1958, 7, 295.
16. BOWEN (W.J.), KERWIN (T.D.).- Arch. Biochem. Biophys., 1956, 64, 278.
17. BROWNSTONE (A.D.).- Annal. Biochem., 1969, 27, 25.
18. BRUCK (A.).- Z. Wiss. Zool., 1914, 110, 481 (in Physiology of Mollusca)
19. CALLAGHAN (O.H.).- Biochem. J., 1957, 67, 651.
20. CALLAGHAN (O.H.), WEBER (G.).- Biochem. J., 1959, 73, 473.
21. CARLSON (C.W.), FINK (S.C.), BROSEMER (R.W.).- Arch. Biochem. Biophys.,
1971, 144, 107.
22. CARTIER (P.), LEROUX (J.P.), MARCHAND (J.C.).- Ann. Biol. Clin., 1967,
25, 109.
23. CERLETTI (P.), BUCCI (E.).- Biochim. Biophys. Acta., 1960, 38, 45.
24. CERLETTI (P.), ZICHELLA (L.).- Clin. Chim. Acta., 1960, 5, 758
(in B.S. 22-12-1652).
25. CERLETTI (P.); DE RITIS (G.).- Clin. Chim. Acta., 1962, 7, 402.
26. CHASE (A.M.).- Meth. of Biochem. Analysis., 1960, 8, 61.
27. CHIGA (M.), PLAUT (G.W.E.).- J. Biol. Chem., 1960, 235, 3260
28. CHIU (C.S.), SU (S.), RUSSELL (P.J.).- Biochim. Biophys. Acta., 1967,
132, 361.

29. CLARKE (J.T.).- Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 428.
30. COHN (W.E.), CARTER (C.E.).- J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 4273.
31. COLOWICK (S.P.).- Methods in Enzymology, 1955, II, 598.
32. COLOWICK (S.P.), KALCKAR (H.M.).- J. Biol. Chem., 1943, 148, 117
(in *The Enzymes*, 1962, 6, 139).
33. COUTANCE (A.).- 1878 (in Arch. Zool. Exptl. gén., 1909, 2, 295).
34. CRANE (R.K.), SOLS (A.).- Méthods in Enzymology, 1955, I, 277.
35. CRISS (W.E.).- J. Biol. Chem., 1970, 245, 6352.
36. CRISS (W.E.), SAPICO (V.), LITWACK (G.).- J. Biol. Chem., 1970, 245, 6346
37. DAVIS (G.M.).- "Proceedings of the Symposium on Mollusca", 1968, Part I, 16.
38. DAVIS (G.M.).- Malacologia, 1968, 7, 17.
39. DAVIS (G.M.).- Jap. J. Parasit., 1969, 18, 93.
40. DAVIS (B.J.).- Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404.
41. DE LEO (P.), GIOVANNOZZI-SERMANNI (G.).- Biochim. Biophys. Acta., 1968, 170, 210.
42. DENUCE (J.M.), CUSHING (J.E.).- In : Protides of the Biological Fluids. Ed. by H. Peeters (Proc. 11th Coll. Bruges, 1963), Amsterdam, Elsevier, 1964, 146.
43. DE ROCHEBRUNE (A.T.).- Mem. Soc. Zool. de Fr., 1904, 17, 191.
44. DUESBERG (P.H.), RUECKERT (R.R.).- Anal. Biochem., 1965, 11, 342.
45. DE DUVE (C.), WATTIAUX (R.), BAUDHUIN (P.).- Advances in Enzymology, 1962, 24, 291.
46. ELODI (P.), SZORENYI (E.T.).- Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung., 1956, 9, 367.
47. ENGELMANN (T.W.).- Arch. Ges. Physiol., 1881, 25, 538.
48. ENNOR (A.H.), MORRISON (J.F.).- Physiol. Rev., 1958, 38, 631.
49. FILDES (R.A.), HARRIS (H.).- Nature, 1966, 209, 261.
50. FISCHER (L.).- In : Laboratory techniques, T.S. and E. Work, Amsterdam-Londres, North. Holland, 1969, 1, 151.
51. FLORKIN (M.).- Aspects moléculaires de l'adaptation et de la phylogénie. Paris - Masson, 1966 (Les Grands Problèmes de la Biologie, vol. 2).
52. FOCANT (B.), PECHERE (S.F.).- Arch. internat. Physiol. Bioch., 1965, 73, 334.
53. FRANC (A.).- In : Traité de Zoologie. Dir. P.P. Grassé. Paris - Masson, 1960, V, 1845.
54. GIRARD (R.).- Cultures marines, 1972, n° 33, nouvelle série, 23.
55. GOLDSPIK (D.F.), HARRIS (J.B.), PARK (D.C.), PENNINGTON (R.J.).- Enzym. Biol. Clin., 1970, 11, 481.
56. GORDON (A.H.), LOUIS (L.N.).- Anal. Biochem., 1967, 21, 190.

57. GRABAR (P.), BURTIN (P.).- Analyse immuno-électrophorétique - Paris - Masson, 1960.
58. GRIFFITHS (D.E.), MORRISON (J.F.), ENNOR (A.H.).- Biochem. J., 1957, 65, 612.
59. HANSON (J.), LOWY (J.).- In : The Structure and function of Muscle. Ed. by G.H.Bourne - New York, London, Academic Press, 1960, I, 265.
60. HASLAM (R.J.), MILLS (D.C.B.).- Biochem. J., 1967, 103, 773.
61. HJERTEN (S.).- Arch. Biochem. Biophys. Suppl 1, 1962, 147, in Maurer (H.R.) - Disc Electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis - Berlin - Walter de Gruyter, 1971.
62. HJERTEN (S.), JERSTEDT(S.), TISELIUS (A.).- Anal. Biochem., 1965, 11, 211.
63. HJERTEN (S.), JERSTEDT(S.), TISELIUS (A.).- Anal. Biochem., 1969, 27, 108.
64. HOMMES (F.A.), RICHTERS (A.R.), BEERE (A.).- Biochim. Biophys. Acta., 1971, 230, 327.
65. HUNEEUS-COX (F.).- Science, 1964, 143, 1036.
66. IMAI (T.), SAKAI (S.).- Tohoku J. Agric. Res., 1961, 12, 125 (in B.A. 1962, 38, 12854).
67. JOVIN (T.), CHRAMBRACH (A.), NAUGHTON (H.).- Anal. Biochem., 1964, 9, 351.
68. JULLIEN(A.), RICHARD (J.G.).- C.R.Soc. Biol., 1936, 122, 1106.
69. KALCKAR (H.M.).- J. Biol. Chem., 1947, 167, 466 (in Meth. of Enzymology 1963, VI, 223).
70. KANE (J.F.), PRIVITERA (C.A.).- Comp. Biochem. Physiol., 1968, 27, 83.
71. KASHIWAGI (N.), SHERER (D.), TOWNS END (C.M.), JACOBS (R.), ONO (K.), KAPUR (B.), STARZL (T.E.).- Investigative Surgery, 1970, vol 67, 789.
72. KAWAGUTI (S.), IKEMOTO (N.).- Biol. J. Okayama Univ., 1958, 4, 191, (in : Physiology of Mollusca).
73. KENDRICK-JONES (J.), PERRY (S.V.).- Biochem. J., 1967, 103, 207.
74. KHOO (J.C.), RUSSELL (P.J.).- J. Biol. Chem., 1970, 245, 4163.
75. KHOO (J.C.), RUSSELL (P.J.).- Fed. Proceedings, 1971, 30, 1221 Abs.
76. KLETHI (J.), MANDEL (P.).- Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 69.
77. KLETHI (J.), MANDEL (P.).- Nature, 1968, 218, 467.
78. KUBY (S.A.), NOLTMANN (E.A.).- The Enzymes, 1962, VI, 515.
79. KUBY (S.A.), NODA (L.), LARDY (H.A.).- J. Biol. Chem., 1954, 209, 191.
80. LACOMBE (G.), THIEM (N.V.), THOAI (N.V.).- Europ. J. Biochem. 1969, 9, 237.
81. LAUREN (T.C.), KILLANDER (J.).- J. Chromatog., 1964, 14, 317.
82. LEBERT (H.).- Ann. Sc. Nat., 1850, 13, (in : Arch. Zool. Exptl. gén. 1909, 2, 295).

83. LEWIS (U.J.), CLARK (M.O.).- Anal. Biochem., 1963, 6, 303.
84. LOHMANN (K.).- Biochem. Z., 1935, 282, 109, (in Physiol. Rev., 1953, 38, 631).
85. LOHMANN (K.).- Biochem. Z., 1936, 286, 28, (in Physiol. Rev., 1958, 38, 631).
86. LONGWELL (A.C.), STILES (S.S.).- Endeavour, 1970, 29, 94.
87. LOOSANOFF (V.L.), DAVIS (H.C.).- In : Advances in Marine Biology. Ed. F.S. Russell - Londres, New York, Academic Press, 1963, I, 2.
88. LORAND (L.).- Fed. Proceedings, 1964, 23, 5, 1, 905 (in Rev. Roum. Biochim., 1968, 5, 69).
89. MAHOWALD (T.A.), NOLTMANN (E.A.), KUBY (S.A.).- J. Biol. Chem., 1962, 237, 1138.
90. MAIZEL (J.V.) Jr.- Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 382.
91. MARCEAU (F.).- Arch. Zool. Exptl. gén. 1909, 2, 295.
92. MARCEAU (P.).- Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique, 1936, 2ème série, fasc. 3, 941.
93. MARGO (Th.).- Sitzber. Akad. Wiss. Wien, 1860, 39, 559 (in Arch. Zool. Exptl. Gén. 1909, 2, 295).
94. MARKLAND (F.S.), WADKINS (C.L.).- J. Biol. Chem., 1966, 241, 4124.
95. MARKLAND (F.S.), WADKINS (C.L.).- J. Biol. Chem., 1966, 241, 4136.
96. MARSHALL (C.F.).- Quart. Journ. Mik. Sc., 1888, 28, 87, (in Arch. Zool. Exptl. Gén., 1909, 2, 295).
97. MILLS (R.R.), COCHRAN (D.G.).- Comp. Biochem. Physiol., 1966, 18, 37, (in B.S. 27-12-14 454).
98. MOLDOVEANU (N.).- Rev. roum. Biochim., 1968, 5, 69.
99. MONNET (R.), MORE (P.), POISBEAU (J.), MORE (M.Th.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest., 1968, 8, 97.
100. MORE (M.Th.), MORE (P.), POISBEAU (J.), MONNET (R.), TAUNAY (F.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest. 1970, 12, 109.
101. MORE (P.).- Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Nantes, 1969, n° 10, 186 p.
102. MORE (P.), MORE (M.Th.), POISBEAU (J.), MONNET (R.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1966, 8, 135.
103. MORE (P.), MORE (M.Th.), POISBEAU (J.), MONNET (R.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1968, 10, 19.
104. MORE (P.), MORE (M.Th.), MONNET (R.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1971, 13, 25.
105. MORE (P.), MORE (M.Th.), MONNET (R.), POISBEAU (J.).- C. R. Acad. Sc., 1971, série D, 273, 222.
106. MORE (P.), MORE (M.Th.), MONNET (R.), POISBEAU (J.).- C. R. Acad. Sc., 1971, série D, 273, 904.
107. MORE (P.), MORE (M.Th.), MONNET (R.), POISBEAU (J.).- C. R. Acad. Sc., 1971, série D, 273, 1331.

108. MORE (P.), MORE (M.Th.), MONNET (R.), POISBEAU (J.).- C.R. Soc. Biol., 1971, 165, 1987.
109. MORE (P.), REBION (G.), MORE (M.Th.), MONNET (R.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1971, 13, 159.
110. MORELAND (B.), WATTS (D.C.), VIRDEN (R.).- Nature, 1967, 214, 458.
111. MORELAND (B.), WATTS (D.C.).- Nature, 1967, 215, 1092.
112. MORRISON (J.F.), GRIFFITHS (D.E.), ENNOR (A.H.).- Biochem. J., 1957, 65, 143.
113. NANNINGA (L.B.).- Arch. Biochem. Biophys., 1962, 96, 51.
114. MINIHAN-NAUSS (K.), DAVIES (R.E.).- Biochem. Z., 1966, 345, 173.
115. NODA (L.).- J. Biol. Chem. 1958, 232, 237.
116. NODA (L.).- The Enzymes, 1962, 6, 139-149.
117. NODA (L.), KUBY (S.A.).- J. Biol. Chem., 1957, 226, 541.
118. NODA (L.), KUBY (S.A.).- J. Biol. Chem., 1957, 226, 551.
119. NODA (L.), KUBY (S.A.).- Methods of Enzymology, 1963, VI, 223.
120. NODA (L.), SHIMIZU (T.).- Fed. Proceedings, 1970, 29, 912 Abs.
121. NUMACHI (K.I.).- Amer. Nat., 1962, 96, 211.
122. OLIVER (I.T.).- Biochem. J., 1955, 61, 116.
123. OLIVER (I.T.), PEEL (J.L.).- Biochim. Biophys. Acta., 1956, 20, 390.
124. ORNSTEIN (L.).- Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 321.
125. OUCHTERLONY (O.).- In : Progress in Allergy ; P. Kallòs and B.H. Walks-mann. Ed. Basel. New York, 1962, VI, 30.
126. PARDEE (A.B.).- In : Structural Chemistry and Molecular Biology ; A.Rich et N. Davidson. Ed. San Francisco, Freeman and Co, 1968.
127. PARK (D.C.), PENNINGTON (R.J.).- Clin. Chim. Acta., 1966, 13, 694.
128. PECHERE (J.F.).- Comp. Biochem. Physiol., 1968, 24, 289.
129. PECHERE (J.F.), DEMAILLE (J.), CAPONY (J.P.).- Biochim. Biophys. Acta, 1971, 236, 391.
130. PENNINGTON (R.J.).- Biochem. J., 1963, 88, 64.
131. PFITZENMEYER (H.T.), SHUSTER (C.N.)Jr.- A partial bibliography of the soft shell clam, *Mya arenaria* L. - Maryland Dpt of Research and Education and the University of Delaware, 1960 (january).
132. PRADEL (L.A.), KASSAB (R.), REGNOUF (F.), THOAI (N.V.).- Biochim.Biophys. Acta, 1964, 89, 255.
133. RACUSEN (D.), CALVANICO (N.).- Anal. Biochem., 1964, 7, 62.
134. RAGGI (A.), RONCA-TESTONI (S.), RONCA (G.).- Biochim. Biophys. Acta., 1969, 178, 619.
135. RANSON (G.).- Rev. Sci. Paris., 1948, 86, 469.
136. RANSON (G.).- Bull. Inst. Océanogr., 1960, n° 1183, 1
137. RANSON (G.).- Rev. Trav. Inst. Peches. Marit., 1967, 31, 127 et 207.

138. ROBIN (Y.), KLOTZ (C.), THOAI (N.V.).- Biochim. Biophys. Acta., 1969, 171, 357.
139. ROBIN (Y.), KLOTZ (C.), THOAI (N.V.).- Europ. J. Biochem., 1971, 21, 170.
140. ROSE (F.), OSTEUX (R.), ROSE (G.), TRAN VAN KY (P.).- Bull. Soc. Zool. Fr., 1966, 91, 345.
141. ROSENBERG (H.), ENNOR (A.H.), MORRISON (J.F.).- Biochem. J., 1956, 63, 153.
142. ROULE (L.).- C. R. Acad. Sci., 1888, 106, 872.
143. RUEGG (J.C.).- In : Biochemistry of Muscle contraction. Ed. J. Gergely - Boston, Little, Brown, 1964, II, part V, 412.
144. RUEGG (J.C.).- Physiol. Rev., 1971, 51, 201.
145. SAX (S.M.), MOORE (J.J.).- Clin. Chemistry, 1968, 14, 660.
146. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (F.).- Enzym. Biol. Clin., 1970, 11, 8.
147. SCHMIDT (G.).- Z. physiol. Chem., 1928, 179, 243 (in Meth. in Enzymology 1955, II, 469).
148. SCHNEIDER (K.C.).- 1902 (in Arch. Zool. Exptl. gén. 1909, 2, 295).
149. SCHWALBE (G.).- Arch. Mikr. Anat., 1869, 5, 205.
150. SCOPES (R.K.).- Biochem. J., 1968, 107, 139.
151. SEED (R.).- Cahiers de biologie marine, 1971, 12, 291.
152. SMITH (J.R.), MOSS (D.W.).- Anal. Biochem., 1968, 25, 500-509.
153. SU (S.), RUSSELL (P.J.).- Biochim. Biophys. Acta., 1967, 132, 370.
154. SU' (S.), RUSSELL (P.J.).- J. Biol. Chem., 1968, 243, 3826.
155. SZEINBERG (A.), KAHANA (D.), GAVENDO (S.), ZAIDMAN (J.), BEN-EZZER (J.).- Acta haemat., 1969, 42, 111.
156. SZEINBERG (A.), TOMASHEVSHY -TAMIR (S.).- Human Heredity, 1971, 21, 289.
157. SZORENYI (E.T.), DVORNIKOVA (P.D.), DEGTYAR (R.G.).- C. R. Acad. Sci. U.R.S.S., 1949, 67, 341 (in physiol. Rev., 1958, 38, 631).
158. TATIBANA (M.), NAKAO (M.), YOSHI KAWA (H.).- J. Biochem. 1958, 45, 1037.
159. TERROSSIAN (E.D.), KASSAB (R.), PRADEL (L.A.), THOAI (N.V.).- Biochim. Biophys. Acta. 1966, 122, 462.
160. THIEM (N.V.), THOAI (N.V.), ROCHE (J.).- Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 285.
161. THOAI (N.V.), THIEM (N.V.), LACOMBE (G.), ROCHE (J.).- Biochem. Biophys. Acta., 1966, 122, 547.
162. TODD (J.K.), BELL (J.L.), BARON (D.N.).- Biochem. J., 1964, 90, 7 P.
163. TOMBS (M.P.), AKROYD (P.).- Acrylamide Gel Electrophoresis - Shandon Instrument Application, 1967, Janvier, n° 18, 16 pages.
164. TONOMURA (Y.), YAGI (K.), MATSUMIYA (H.).- Arch. Biochem. Biophys., 1955, 59, 76.

165. TRAN VAN KY (P.), ROSE (F.), LAUDE (F.).- C. R. Acad. Sci., 1962, 255, 366.
166. UHR (M.L.), MARCUS (F.), MORRISON (J.F.).- J. Biol. Chem., 1966, 241, 5428.
167. VAISMAN (A.), PARIS-HAMELIN (A.).- Travaux Pratiques de sérologie et d'immunologie : Paris, Librairie le Francois; 1969.
168. VIALA (B.), ROBIN (Y.), Van THOAI (N.).- Comp. Biochem. Physiol., 1970, 32, 401.
169. VIRDEN (R.), WATTS (D.C.).- Comp. Biochem. Physiol., 1964, 13, 161.
170. VIRDEN (R.), WATTS (D.C.), BALDWIN (E.).- Biochem.J., 1965, 94, 536.
171. VIRDEN (R.), WATTS (D.C.), WATTS (R.L.), GAMMACK (D.B.), RAPER (J.H.).- Biochem. J., 1966, 99, 155.
172. VLES (F.).- Mémoires de la Société Zool. de Fr., 1909, 22, 90.
173. WADDELL (W.J.).- J. Lab. Clin. Med., 1956, 48, 311.
174. WAGENER (G.R.).- Arch. F. Anat., 1863, 30 (in Arch. Zool. Exptl. gén. 1909, 2, 295).
175. WARBURG (O.), CHRISTIAN (W.).- Biochem Z., 1936, 287, 291
176. WARBURG (O.), CHRISTIAN (W.).- Biochem Z., 1941, 310, 384
177. WATTS (D.C.), MORELAND (B.), TATCHELL (E.C.), BANNISTER (L.H.).- Comp. Biochem. Physiol., 1968, 25, 553.
178. WATTS (D.C.), MORELAND (B.).- Exp. in Physiol and Biochem., 1970, 3, 1.
179. WIESMANN (U.), RICHTERICH (R.).- Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 1964, 22, 1.
180. WILLIAMS (C.A.), CHASE (M.W.).- Methods of Immunology and Immunochemistry - Londres, New York. Acad. Press., 1967 : I.
181. WOOLSEY (M.E.), MANDY (W.J.).- J. Immunol. 1970, 104, 475.
182. WORK (T.S.), WORK (E.).- Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology - North Holland - Amsterdam - London, 1970, vol I.

LIVRES GENERAUX

- BARMAN (T.E.).- Enzyme Handbook - Berlin/new York, Springer Verlag, 1969, I et II
- BOEHRINGER Mannheim France (Société).- Documentation générale sur les enzymes Paris - France
- BERGMAYER (H.U.) (Ed.).- Methods of Enzymatic Analysis - Londres/New York Acad. Press., 1963.

- BOURNE (G.H.) (Ed.).- The Structure and Function of Muscle - New York, London - Acad. Press., 1960 - I, II, III.
- BOYER (P.D.), LARDY (H.), MYRBACK (K.) (Ed.).- The Enzymes - Londres/New York Acad. Press., 1960.
- CANALCO (Société).- Documentation générale sur la "disc électrophorèse". Bethesda Md U.S.A..
- COLOWICK (S.P.), KAPLAN (N.O.) (Ed.).- Methods in enzymology - New York, Acad. Press, 1955.
- CROWLE (A.J.).- Immunodiffusion - Londres/new York, Acad. Press., 1961
- DETERMANN (H.).- Chromatographie sur gel - Paris, Masson, 1969;
- DIXON (M.), WEBB (E.C.).- Enzymes - Londres, Longmans, Green and Co, 1964
- GALTISOFF (P.S.).- The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin - Fishery Bull. Fish and Wildlife Service, 1964, 64.
- GRASSE (P.P.), dir.- Traité de Zoologie - Paris, Masson, 1960, V, fasc. 2.
- HAWKES (J.G.) (ed.).- Chemotaxonomy and serotaxonomy - Published for the Systematics Association by Acad. Press. 1968 - Special volume n° 2.
- MAURER (H.R.).- Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. - Berlin, Walter de Gruyter, 1971.
- NEEDHAM (D.M.).- Machina Carnis - The biochemistry of muscular contraction in its historical development - Cambridge at the University Press, 1971
- PHARMACIA (Société).- Documentation générale sur les Sephadex - Uppsala Suède.
- RANSON (G.).- Les huîtres, Biologie - Culture - Paris, Lechevalier, 1951.
- SCHWICK (H.G.), STORIKO (K.).- Cahiers de Laboratoire : identification et dosage des protéines plasmatiques par précipitation immunologique. Behringwerke A G - 1967
- WILBUR (K.M.), YONGE (C.M.) (Ed.).- Physiology of Mollusca - New York, London, Acad. Press, 1964, I, 1966, II.
- WILLIAMS (C.A.), CHASE (M.W.) (ed.).- Methods in immunology and immunochemistry - Londres/New York, Acad. press. 1967 : I, 1968 : II, 1971 : III.
- WORK (T.S.), WORK (E.) (Ed.).- Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology - Amsterdam/Londres - North Holland , 1969, I.
- YONGE (C.M.).- "Oysters". Londres; Collins, 1960.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CLASSIFICATION DES MOLLUSQUES ETUDIES</u>	4
<u>ABREVIATIONS</u>	5
<u>PREMIERE PARTIE</u>	
METHODES DE CHROMATOGRAPHIE ET D'ELECTROPHORESE ANALYTIQUES	
A - Les muscles adducteurs des Lamellibranches	7
1) Le muscle adducteur des Ostreidae	7
2) Le muscle adducteur des Pectinidae	8
3) Les muscles adducteurs des dimyaires étudiés	10
B - Les protéines solubles	11
C - L'extraction et le fractionnement des protéines solubles	12
1) Chromatographie en couche mince	13
2) Electrophorèse en gel de polyacrylamide	14
3) Electrophorèse sur Cellogel RS	18
D - Matériel biologique utilisé	20
E - Résultats	22
1) Résultats obtenus par chromatographie en couche mince de gel de Sephadex	22
2) Résultats obtenus par électrophorèse en gel de poly- acrylamide	27
3) Résultats obtenus par électrophorèse sur Cellogel RS	35
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	
ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	
A - Méthode adoptée	38
1) Principe de la méthode	39
2) Appareillage	39

3) Mode opératoire	43
a. tampons et gels	43
b. préparation et mise en place de la colonne	44
c. préparation et mise en place des échantillons	44
d. électrophorèse	45
B - Protocole expérimental	45
1) Les extraits protéiques	45
2) Le fractionnement primaire	46
3) L'électrophorèse préparative	47
C - Application à l'isolement des bandes caractéristiques	48
1) Fractionnement primaire	49
2) Electrophorèse préparative	56
3) Etude des tracés électrophorétiques	60
4) Contrôle	65

TROISIEME PARTIE

METHODES IMMUNOLOGIQUES	68
A - Protocoles d'immunisation	70
B - Méthodes générales d'étude	72
1) Méthode de diffusion en plaque suivant la technique d'Ouchterlony	73
2) Méthode d'immuno-électrophorèse selon Grabar	74
C - Mise au point des techniques utilisées	74
1) Choix du gel	75
2) Choix du tampon	75
3) Contrôle des immun-sérums	76
a. premier protocole d'immunisation	76
b. second protocole d'immunisation	78
4) Quantités d'extraits et d'immun-sérum à utiliser	79
5) Intérêt des immun-sérums lyophilisés	81
D - Expériences comparatives entre diverses Ostreidae	82

QUATRIEME PARTIE

METHODES ENZYMOLOGIQUES	88
A - Généralités sur l'adénylate kinase et l'arginine kinase	88
1) Caractères et intérêts de ces enzymes	88
a. adénylate kinase	88
b. arginine kinase	92
2) Méthodes générales de mesure de l'activité adénylate kinasique	95
a. réaction simple	96
b. réactions couplées	96
- réactions couplées à 2 constituants	97
. Emploi de l'AMPdéaminase	97
. Emploi de la créatine kinase	97
. Emploi de la Myosine-ATPase	97
. Emploi de l'hexokinase	98
. Emploi du système Luciférine-Luciférase	98
- réactions couplées à 3 constituants	98
. réaction directe	100
. réaction inverse	100
3) Méthodes générales de mesure de l'activité arginine kinasique	101
a. réaction simple	101
b. réactions couplées	102
B - Mesures des activités enzymatiques des protéines solubles du muscle adducteur des Mollusques Lamellibranches	102
1) Matériel biologique	102
2) Activité adénylate kinasique	104
a. principe	104
b. appareillage	105
c. réactifs utilisés	105
d. mode opératoire	106
e. expression des résultats	107
f. essais préliminaires	108
g. étude cinétique	111

3) Activité arginine kinasique	112
a. principe	112
b. appareillage	112
c. réactifs utilisés	112
d. mode opératoire	112
e. expression des résultats	113
f. essais préliminaires	113
g. étude cinétique	115
4) Application des méthodes à des extraits d'huîtres	115
C - Localisation des activités enzymatiques sur les profils chromatographiques	118
D - Estimation des poids moléculaires des deux enzymes	125
1) Emploi de la chromatographie sur couche mince	125
a. étude comparative des migrations : extrait total - fractions enzymatiques	125
b. étude comparative d'adénylate kinases	126
c. étude comparative des migrations : extrait total - mélange d'enzymes	127
2) Emploi de la chromatographie sur colonne	128

CONCLUSION

Vu, le Président de Thèse,

R. MONNET

Vu, le Doyen de la Faculté,

L. SPARFEL

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie de NANTES.

C. DELORME

